

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA**



**PRODUCCIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER
ACTIVADAS CON INTERLEUQUINA-15 PARA USO
CLÍNICO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON CÁNCER**

**Tesis doctoral
María Dolores Corral Sánchez**

Madrid 2018

PRODUCCIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER ACTIVADAS CON INTERLEUQUINA-15 PARA USO CLÍNICO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON CÁNCER

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN: En las últimas décadas se han mejorado las tasas de supervivencia de los tumores infantiles. Sin embargo, la recaída y la refractariedad aún condicionan un mal pronóstico. Por ello es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar los índices de curación. La inmunoterapia constituye un procedimiento con un desarrollo prometedor. Dentro de ella se incluye la inmunoterapia basada en células Natural Killer (NK).

Diferentes estudios publicados han demostrado el potencial terapéutico de las células NK, en ausencia de efectos adversos severos. La actividad citotóxica inmediata de las células NK, la posibilidad de expandirlas y manipularlas bajo condiciones de Normas de Correcta Fabricación, y la posibilidad de combinarlas con otros tratamientos, hacen de estas células un arma terapéutica potente a desarrollar.

Por ello, se pretende analizar en esta tesis doctoral la plausibilidad del uso de los principales métodos de selección y expansión que actualmente se utilizan para la terapia celular con células NK en pacientes pediátricos con cáncer.

OBJETIVOS: Los objetivos de esta tesis son:

- Describir los procesos de producción de células NK para uso clínico a partir de sangre periférica de donantes sanos: Células NK activadas *ex vivo* con IL-15 (NK-IL15) y células NK activadas y expandidas *ex vivo* (NKAE).
- Comparar las características morfológicas y funcionales de los productos finales.
- Describir la utilización de estos productos en tres ensayos clínicos con pacientes pediátricos con tumores sólidos y leucemias refractarias o en recaída.
- Evaluar si existe correlación entre el número de células NKAE y de linfocitos T (LT) infundidos y la respuesta tumoral.

MATERIAL Y MÉTODOS: Los productos NK-IL15 Y NKAE fueron obtenidos a partir de leucoaféresis de donantes sanos haploidénticos.

Las NK-IL15 se obtienen utilizando el sistema CliniMACS®. En primer lugar se realiza purgado de LT y posteriormente selección de la población NK. Por último, se incuban *ex vivo* con IL-15 para estimular las células NK.

Las NKAE se obtienen mediante cocultivo con la línea celular K562-mbIL15-41BBL irradiada, en un medio suplementado con IL-2 durante 14-21 días.

En los productos finales, se analiza la cantidad de células NK y LT, así como la expresión de receptores en la superficie de las células NK activadas y su capacidad citotóxica.

Estos productos se utilizaron en tres ensayos clínicos con pacientes pediátricos. Las NK-IL15 se infundieron en pacientes con tumores sólidos refractarios tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) haploidéntico. Las NKAЕ se utilizaron en dos ensayos clínicos con pacientes con leucemia aguda refractaria o en recaída, en combinación con distintos regímenes de quimioterapia.

RESULTADOS: El número de células NK obtenidas por ambos procedimientos fue similar. Se observó menor cantidad de LT en NK-IL15 que en NKAЕ. La expresión de receptores activadores en la superficie de las células NK activadas (CD69, CD25, NKG2D, NKp44, NKp46, NKp30, DNAM-1) fue superior que en células NK basales en ambos productos, siendo superior en el caso de las NKAЕ. NK-IL15 y NKAЕ presentan mayor actividad citotóxica que las células NK basales. No se encontraron alteraciones genéticas ni potencial oncogénico en ninguno de los productos.

En el ensayo con NK-IL15 participaron 6 pacientes, realizándose un total de 8 infusiones. La mediana de células NK infundidas fue de $11,3 \times 10^6/\text{kg}$ ($3\text{--}27 \times 10^6/\text{kg}$). La cantidad de LT fue $<1 \times 10^3/\text{kg}$ ($0\text{--}0,75 \times 10^3/\text{kg}$). Las infusiones se realizaron 30 días tras un TPH haploidéntico. No se registraron efectos adversos relacionados con las infusiones. En cuatro pacientes se observó respuesta tumoral (1 paciente presentó muy buena remisión parcial, 2 remisión parcial y uno estabilización de la enfermedad). Un paciente progresó y en otro no se pudo evaluar la respuesta. Todos los pacientes fallecieron tras una mediana de seguimiento de 310 días, 4 por progresión y 4 por toxicidad relacionada con el TPH.

En los ensayos con NKAЕ se infundieron un total de 52 productos con una mediana de $6,76 \times 10^6$ células NK/kg ($0,7\text{--}34,16 \times 10^6$) y $0,49 \times 10^6$ LT/kg ($0\text{--}11 \times 10^6$). Participaron en estos ensayos un total de 18 pacientes, consiguiendo remisión completa al final de los ensayos en el 72%. Todas las infusiones fueron bien toleradas, sin objetivarse efectos adversos severos ni casos de enfermedad injerto contra receptor relacionados con las infusiones. En Julio de 2018, tres pacientes permanecían vivos, sin evidencia de enfermedad.

CONCLUSIONES: Los métodos de producción de células NK para uso clínico descritos en este trabajo son factibles y permiten obtener una elevada cantidad de células NK activadas. Las características morfológicas y funcionales de ambos productos finales son diferentes. Ambos productos presentan una

mayor expresión de receptores activadores que las células NK basales, lo que se relaciona con mayor citotoxicidad antitumoral *in vitro*. Su infusión a pacientes pediátricos es segura, sin registrarse reacciones adversas severas y presentan un efecto terapéutico positivo. Se ha observado una correlación positiva entre el número de células NKAE y de LT infundidos y la respuesta tumoral, existiendo una tendencia a mejor respuesta en los pacientes que han recibido mayor cantidad de células NKAE y mayor cantidad de LT.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA**



**PRODUCCIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER
ACTIVADAS CON INTERLEUQUINA-15 PARA USO
CLÍNICO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON CÁNCER**

**Tesis doctoral presentada por:
María Dolores Corral Sánchez**

**Director de la tesis:
Antonio Pérez Martínez**

Madrid 2018



EL DR. ANTONIO PÉREZ MARTÍNEZ, JEFE DE SERVICIO DE ONCOHEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA DE LA UAM

CERTIFICA: Que Dña. **MARIA DOLORES CORRAL SÁNCHEZ**, Licenciada en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado **“Producción de células Natural Killer activadas con Interleuquina-15 para uso clínico en pacientes pediátricos con cáncer”**, para optar al Grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para ser sometido a lectura y discusión ante el Tribunal.

En Madrid, a 30 de Julio de 2018.

Fdo. Antonio Pérez Martínez

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Antonio, por sus enseñanzas, consejos y paciencia.

A todas las personas que han participado en estos proyectos, por hacer un trabajo impecable.

A mi familia, por su apoyo incondicional, sin el que este trabajo no hubiera podido ser posible.

A mi padre, porque se hubiera sentido orgulloso de verme presentar esta tesis.

A Jesús y a Diego, por estar conmigo siempre y creer en mí.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	19
1.- CELULAS NATURAL KILLER	23
2.- RECEPTORES KIR	27
2.1.- Haplotipos KIR	29
2.2.- “Score de Cooley”	30
3.- CARACTERÍSTICAS DE LAS CITOQUINAS IL-2 E IL-15.....	31
3.1.- Características de la IL-2.	31
3.2.- Características de la IL-15.	32
3.3.- Diferencias principales entre IL-2 e IL-15.	35
4.- INMUNOTERAPIA CON CÉLULAS NK.....	36
4.1.- Antecedentes históricos: células LAK.....	36
4.2.- Células NK autólogas.....	36
4.3.- Células NK alogénicas	37
4.4.- Líneas celulares NK (expansión <i>ex vivo</i>).....	38
4.5.- Células NK modificadas genéticamente.	39
5.- FUENTES DE CÉLULAS NK PARA LA PRÁCTICA CLÍNICA.	40
5.1.- Cordón umbilical.	40
5.2.- Médula ósea/células embrionarias.	40
5.3.- Sangre periférica.	41
6.- MANUFACTURACIÓN DE CÉLULAS NK PARA USO CLÍNICO.....	41
6.1.- Selección inmunomagnética de células NK.....	41
6.2.- Sistema de activación y expansión de células NK.....	42
6.3.- Método de estimulación con IL-15 (NK-IL15).	43
7.- SELECCIÓN DE DONANTE HAPLOIDÉNTICO.	44
8.- SITUACION ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN CON CÉLULAS NK	45
JUSTIFICACIÓN	49
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
HIPÓTESIS.....	55
OBJETIVOS.....	56
METODOLOGÍA	57
1.- SELECCIÓN DE LOS DONANTES.....	59
2.- PRODUCCIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER ACTIVADAS <i>EX VIVO</i> CON IL-15 (NK-IL15).....	60
2.1.- Sistema CLINIMACS®. Componentes del CliniMACS System®.	60
2.2.- Material necesario para el método de selección.....	61
2.3.- Método de funcionamiento del sistema CliniMACS®.	62
2.4.- Descripción del proceso de selección de la población NK.	63

3.- PRODUCCIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER ACTIVADAS Y EXPANDIDAS (NKAE) CON LA LÍNEA CELULAR K562-MBIL15-41BBL.....	68
4.- ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DEL PRODUCTO FINAL.....	70
4.1.- Características morfológicas.....	70
4.2.- Características funcionales.....	71
4.3.- Análisis microbiológicos.....	72
4.4.- Análisis moleculares.....	72
5.- UTILIZACIÓN DE NK-IL15 Y NKAE EN ENSAYOS CLÍNICOS.....	73
5.1.-Trasplante haploidéntico e infusión de células NK estimuladas con IL-15 en pacientes con tumores sólidos refractarios. Código EudraCT 2009-01 0186-23. (NCT01337544)...	73
5.2.-Infusión de células Natural Killer en combinación con quimioterapia en pacientes pediátricos con leucemia/linfoma T refractaria. Estudio LLAT. Código EudraCT: 2012-000054-63. (NCT01944982).....	75
5.3.-LANK-2: Inmunoterapia con células NKAE junto con quimioterapia de rescate en el niño con leucemia aguda en recaída o refractariedad. Estudio Lydia. Código EudraCT 2012-005146-38. (NCT02074657).....	76
6.- EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD.....	78
7.- EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA.....	78
8.- ESTUDIO DEL QUIMERISMO.....	79
9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	79
RESULTADOS.....	81
1.- PRODUCCIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER ACTIVADAS <i>EX VIVO</i> CON IL-15 (NK-IL15).....	83
1.1.- Efectividad del proceso.....	87
1.2.- Análisis microbiológico.....	88
1.3.- Análisis molecular de seguridad.....	88
1.4.- Características fenotípicas del producto NK-IL15 por citometría de flujo.....	88
2.- PRODUCCIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER ACTIVADAS Y EXPANDIDAS (NKAE) CON LA LÍNEA CELULAR K562-MBIL15-41BBL.....	89
2.1.- Células totales.....	89
2.2.- Células NK.....	90
2.3.- Linfocitos T.....	90
2.4.- Células NKT.....	91
2.5.- Distribución de las poblaciones celulares.....	92
2.6.- Viabilidad de los productos.....	93
2.7.- Expansión de las poblaciones celulares.....	93
2.8.- Fallos de expansión.....	94
2.9.- Análisis microbiológico.....	95
2.10.- Análisis molecular de seguridad.....	95
2.11.- Características fenotípicas del producto NKAE por citometría de flujo.....	95
3.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES.....	97

4.- CITOTOXICIDAD DE LOS PRODUCTOS NKIL-15 Y NKAЕ.....	100
5.- RESULTADOS CLÍNICOS DEL ENSAYO CON NK-IL15.....	101
5.1.- Características epidemiológicas de los pacientes.	101
5.2.- Características de los donantes y del injerto.	103
5.3.- Células NK-IL15 infundidas.....	103
5.4.- Evaluación de la toxicidad.....	104
5.5.- Evaluación de la respuesta y seguimiento de los pacientes.	105
6.- RESULTADOS CLÍNICOS DE LOS ENSAYOS CON NKAЕ.....	107
6.1.- Características epidemiológicas de los pacientes.	107
6.2.- Células infundidas.	109
6.3.- Características de los donantes.....	110
6.4.- Desarrollo de los ensayos.....	111
6.5.- Evaluación de la toxicidad.....	113
6.6.- Evaluación de la respuesta.	117
6.7.- Seguimiento de los pacientes. Supervivencia.	122
7.- RELACIÓN ENTRE NÚMERO DE CÉLULAS INFUNDIDAS Y RESPUESTA TUMORAL.	126
DISCUSIÓN	127
1.- USO DE CÉLULAS NK COMO INMUNOTERAPIA EN PACIENTES CON CÁNCER.....	129
2.- DISFUNCIÓN DE CÉLULAS NK EN PACIENTES CON CÁNCER Y SU REPERCUSIÓN EN SU USO COMO INMUNOTERAPIA. IMPORTANCIA DE LA DISPARIDAD KIR/HLA.	130
3.- DIFERENTES ESTRATEGIAS DE EXPANSIÓN Y ACTIVACIÓN DE CÉLULAS NK PARA USO CLÍNICO.	132
4.- COMPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS NKIL-15 Y NKAЕ.....	134
5.- EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y EFECTIVIDAD EN EL USO CLÍNICO....	137
6.- LIMITACIONES DEL TRABAJO.....	141
7.- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	141
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	147
ANEXOS	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principales receptores conocidos de las células NK y sus ligandos	25
Figura 2: Mecanismos de citotoxicidad de las células NK	26
Figura 3: Haplotipos KIR-A y KIR-B	29
Figura 4: Purgado CD3	65
Figura 5: Selección CD56	66
Figura 6: Pasos de la producción de NK-IL15	67
Figura 7: CliniMACS System®	67
Figura 8: Pasos de la producción de NKAЕ	69
Figura 9: Protocolo de tratamiento del ensayo NK-IL15	74
Figura 10: Protocolo de tratamiento del ensayo LLAT	76
Figura 11: Protocolo de tratamiento del ensayo Lydia	78
Figura 12: Células totales en cada paso del proceso de producción	85
Figura 13: Células NK en cada paso del proceso de producción	85
Figura 14: LT en cada paso del proceso de producción	86
Figura 15: Cinética de las poblaciones linfocitarias	86
Figura 16: Características morfológicas del producto NK-IL15 por citometría de flujo	88
Figura 17: Evolución del número de células totales en cultivo	89
Figura 18: Evolución de las células NK en cultivo	90
Figura 19: Evolución de los LT en cultivo	91
Figura 20: Evolución de las células NKT en cultivo	91
Figura 21: Cinética de las poblaciones linfocitarias NK, LT y NKT en los diferentes días de cultivo	92
Figura 22: Distribución de las poblaciones celulares en los distintos días de cultivo ...	93
Figura 23: Expansión de las poblaciones celulares en los distintos días de cultivo	94
Figura 24: Perfil genético de los productos NKAЕ	95
Figura 26: Expresión de receptores en NK basales, NKAЕ y NK-IL15	97
Figura 27: Datos representativos de la expresión de receptores en NK basales, NK-IL15 y NKAЕ	99
Figura 28: Actividad citotóxica de los productos finales para los ratios 8:1, 4:1, 2:1 y 1:1. NKAЕ y NK-IL15 presentan mayor actividad citotóxica que las NK basales	100
Figura 29: Número de células totales, NK y LT infundidos	104
Figura 30: Evaluación de la respuesta en los pacientes #1, #2, #3 y #6	106
Figura 31: Representación de las medias y DS de las células infundidas en el día +21	110
Figura 32: Diagrama de flujo de los ensayos LLAT/Lydia	112
Figura 34: Porcentaje de blastos previo al tratamiento y tras ciclos 1 y 2	119
Figura 35: EMR previo al tratamiento y tras ciclos 1 y 2	119

Figura 36: Relación entre el pico de quimerismo y la respuesta tumoral.....	122
Figura 37: Supervivencia al finalizar los ensayos.....	123
Figura 38: Supervivencia tras período de seguimiento.....	124
Figura 39: Comparativa de curvas de supervivencia de LLAT y Lydia al finalizar los ensayos	125
Figura 40: Relación entre número de NKAE infundidas y respuesta tumoral	126
Figura 41: Relación entre número de LT infundidos y respuesta tumoral.....	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales receptores KIR y sus ligandos correspondientes	28
Tablas 2 y 3: Cálculo del “ <i>score de Cooley</i> ”.....	30
Tabla 4: Situación actual de la investigación con células NK	46
Tabla 5: Número de células totales, LT y células NK en cada procedimiento	84
Tabla 6: Efectividad	87
Tabla 7: Media \pm DS de células NK y de LT en cada paso.....	87
Tabla 8: Distribución de las poblaciones celulares en los días de cultivo	92
Tabla 9: Viabilidad en los distintos días de cultivo	93
Tabla 10: Expansión de las poblaciones celulares.....	94
Tabla 11: Expansión de las poblaciones celulares en LLAT.....	94
Tabla 12: Expresión de receptores en NK basales, NKAE y NK-IL15	97
Tabla 13: Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes incluidos en el ensayo NK-IL15	102
Tabla 14: Disparidad KIR/HLA entre donantes y receptores	103
Tabla 15: Efectos adversos registrados durante el ensayo con NK-IL15.....	105
Tabla 16: Respuesta al tratamiento y supervivencia	105
Tabla 17: Características epidemiológicas de los pacientes de LLAT/Lydia.....	108
Tabla 18: Número de infusiones realizadas a cada paciente, cantidad total de NKAE y LT recibidos	109
Tabla 19: Características de los productos infundidos	110
Tabla 20: Disparidad KIR/HLA receptor/donante	111
Tabla 21: “ <i>Score de Cooley</i> ” calculado para los donantes	111
Tabla 22: Efectos adversos > grado II en LLAT y Lydia	114
Tabla 23: Pico de quimerismo alcanzado.....	121

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARNm: ARN mensajero
Ara-G: Nelarabina
Asn: Asparagina
ATG: Globulina antitimocítica
BiKEs/TriKEs: Anticuerpos biespecíficos/triespecíficos
BK virus: Poliomavirus
Bu: Busulfán
CAR: Receptor quimérico antigénico.
CCDA: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica
CGH: Hibridación Genómica Comparativa
cGy: Centigray (unidad de radiación)
CLOVE: Clofarabina, etopósido y ciclofosfamida
CMN: Células mononucleares
CMV: Citomegalovirus
CTCAE: Criterios Terminológicos Comunes para Eventos Adversos
Cy: Ciclofosfamida
DS: Desviación estándar
EICR: Enfermedad injerto contra receptor
EMR: Enfermedad mínima residual
ET: Error típico
FasL: Ligando de Fas
FDA: Del inglés “*Food and Drug Administration*”
FLAG-Ida: Fludarabina, idarrubicina, citarabina y G-CSF
Flu: Fludarabina
FMO: Fallo multiorgánico
G+D: Gemcitabina + docetaxel
G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos
Gy: Gray (unidad de radiación)
HDCT: Altas dosis de quimioterapia + rescate autólogo
HLA: Antígeno leucocitario humano
HSA: Albúmina sérica humana
ICT: Irradiación corporal total
If: Ifosfamida
IFN-γ: Interferón gamma
IL: Interleuquina
IQR: Rango intercuartílico
ITAM: Del inglés “*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*”
ITIM: Del inglés “*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*”
kDa: Kilodalton
KIR: Del inglés “*Killer Immunoglobuline like*”

LAK: Del inglés "*Lymphocyte activated killers*"
LB: Linfocito B
LLA: Leucemia linfoblástica aguda
LMA: Leucemia mieloide aguda
LT: Linfocito T
Lys: Lisina
M: Mujer
MTA: Del inglés "*Material Transfer Agreement*"
NCF: Normas de correcta fabricación
NCR: Receptor de citotoxicidad natural
NK: Natural Killer
NKAE: Células Natural Killer activadas y expandidas
OKT3: Muromonab-CD3
OMS: Organización Mundial de la Salud
PBS: Tampón salino fosfato
RC: Remisión citológica
RECIST: Criterios de Evaluación de Respuesta de los Tumores Sólidos
rpm: Revoluciones por minuto
RPMI: Medio celular de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*
RT: Radioterapia
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Ser: Serina
SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido
STR: Regiones microsatélites polimorfos
TAC: Tomografía Axial Computarizada
T+I: Temozolomida +irinotecan
TERT: Telomerasa transcriptasa inversa
Thi: Tiotepa
TIT: Triple terapia intratecal
TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa
To+C: Topotecan + carboplatino
TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos
TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
UI: Unidades internacionales
V: Varón
VCR: Vincristina
VEB: Virus Epstein-Barr
VHH-6: Virus herpes tipo 6
VHS-1: Virus herpes simple tipo 1
VIH: Virus de Inmunodeficiencia humana
VP: Etopósido

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha producido un importante incremento en las tasas de supervivencia del cáncer infantil. A pesar de ello, continúa siendo la primera causa de muerte por enfermedad en niños a partir del año de edad. Según datos del Registro Español de Tumores Infantiles, la tasa de supervivencia a cinco años alcanza el 80%, siendo deseable llegar a alcanzar el 100%.

Las leucemias agudas constituyen la neoplasia más frecuente en la edad pediátrica, suponiendo aproximadamente un 30% de los tumores infantiles. Dentro de ellas, el 80% son leucemias linfoblásticas agudas (LLA) y alrededor del 15% leucemias mieloides agudas (LMA). Actualmente, la tasa de supervivencia es superior al 80-90% a los cinco años en LLA y 65-70% en LMA, gracias fundamentalmente a la estandarización de protocolos^{1,2}. Sin embargo, la recaída y la refractariedad al tratamiento convencional condicionan un mal pronóstico con supervivencias inferiores al 40%. Por ello es necesario desarrollar nuevas estrategias para mejorar los índices de curación. En la última década se han desarrollado nuevos esquemas de quimioterapia de rescate, basados en nuevas drogas como la clofarabina, cladribina, azacitidina o la nelarabina que han conseguido aumentar las tasas de remisión en leucemias refractarias. Sin embargo, todavía las tasas de recaída y la toxicidad del régimen de quimioterapia son muy elevadas.

La inmunoterapia constituye un procedimiento terapéutico con un desarrollo prometedor. Dentro de ella se incluye la inmunoterapia basada en células Natural Killer (NK).

En los últimos años se han realizado numerosos avances en el conocimiento del sistema inmune y su importante papel en la prevención de neoplasias, dentro de un proceso conocido como “inmunovigilancia”³. La mayoría de los individuos sanos son capaces de eliminar células tumorales a diario gracias a su eficaz sistema inmune. Sin embargo, en pacientes con cáncer, se han descrito numerosas alteraciones tanto en el sistema inmune innato como adaptativo.

Las células NK son parte fundamental del sistema inmune innato, junto con monocitos, macrófagos y células dendríticas.

La actividad citotóxica de las células NK fue descrita por primera vez en 1964 por Cudkowick y Stimpfling en animales de laboratorio⁴. En 1975, el grupo del Dr. Herberman^{5,6} describió la población NK en humanos como una población celular similar a los linfocitos, con capacidad citotóxica espontánea frente a células tumorales o infectadas por virus. Más tarde, el grupo del Dr. Karre^{7,8} propuso como hipótesis para explicar estos hallazgos, que la citotoxicidad de

las células NK se desencadena por la pérdida de expresión del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I en las células tumorales o infectadas. Desde entonces, se han identificado diferentes familias de receptores en las células NK para reconocer la molécula HLA de clase I (HLA-1) en el paciente e inducir tolerancia.

Debido a esta capacidad para lisar células tumorales que no expresan HLA-I, o expresan un HLA-I diferente o aberrante, las células NK presentan un alto potencial terapéutico contra el cáncer y pueden mejorar los efectos beneficiosos del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), incrementando el efecto antileucemia o antitumoral del mismo tras un TPH alogénico HLA no idéntico, fundamentalmente de donante haploidéntico⁹. Mientras que las terapias convencionales basadas en linfocitos T (LT), como las infusiones de linfocitos de donante, se asocian a enfermedad de injerto contra receptor (EICR), las infusiones de células NK podrían mediar un efecto de injerto contra leucemia en ausencia de EICR.

La experiencia más evidente del efecto antitumoral de las células NK se ha estudiado en el contexto del TPH. Grupos clínicos liderados por la Dra. Ruggeri del Hospital de Perugia (Italia), en 2002¹⁰ y el Dr. Rubnitz en el Hospital de St. Jude (Memphis, EEUU), en el año 2010¹¹ observaron que la ausencia de HLA clase I en las células leucémicas y la presencia de receptores inhibidores "*Killer Immunoglobuline like*" (KIR) en las células NK del donante desencadenan un potente efecto celular contra la leucemia tanto en el contexto del TPH como fuera de él. Además, las células NK constituyen la primera subpoblación linfocitaria que se recupera tras el TPH, aunque su capacidad citotóxica y de producción de citoquinas se encuentra disminuida respecto a las células NK de individuos sanos. A pesar de esto, el injerto de células NK puede facilitar el de las demás poblaciones celulares y además puede ejercer un efecto protector frente a la EICR, las infecciones y la recaída¹².

Por otro lado, estudios preclínicos han demostrado la capacidad citotóxica de las células NK frente a líneas celulares de sarcoma de Ewing, neuroblastoma, rabdomiosarcoma y osteosarcoma, por lo que la infusión de células NK también es prometedora para el tratamiento de tumores sólidos refractarios o en recaída¹³.

En los últimos años se ha desarrollado la terapia con células NK alogénicas fuera del contexto del TPH, obtenidas de donantes sanos y posteriormente expandidas y activadas *ex vivo* antes de ser infundidas al paciente.

Las células NK son candidatas ideales para inmunoterapia contra el cáncer ya que cumplen los siguientes criterios: rapidez de acción, potencia, especificidad amplia, potencial de selección de donantes óptimos, ausencia de efectos

secundarios graves y posibilidad de uso complementario con otros tratamientos como la quimioterapia. Por eso, es necesario construir una base sólida estableciendo la seguridad y plausibilidad de las infusiones celulares a pacientes, previo a implementarlas en la práctica clínica.

Entre las limitaciones para su uso sistemático en la práctica clínica destacan la complejidad en la manufacturación celular; la necesidad de infundir un gran número para obtener resultados clínicos relevantes y la necesidad de hacerlo en condiciones que cumplan con las Normas de Correcta Fabricación (NCF) para uso humano, lo que conlleva costes y necesidad de laboratorios especialmente diseñados para ello³.

1.- CELULAS NATURAL KILLER.

Las células NK son linfocitos del sistema inmune innato que funcionan como primera línea de defensa contras las infecciones virales y las células tumorales. Desencadenan una respuesta espontánea sin necesidad de sensibilización previa. Fenotípicamente expresan el marcador CD56 y carecen del receptor de células T (TCR CD3). Se producen en la médula ósea a partir del progenitor hematopoyético CD34+ y migran para su diferenciación a los tejidos linfáticos, bazo, hígado, pulmones y sangre periférica^{3,8,9,14-17}. Se desarrollan con normalidad en pacientes con hipoplasia de timo, como en el síndrome de Di George⁶. Suponen alrededor de un 15-29% de los linfocitos circulantes en sangre periférica, pudiendo ser su proporción variable por numerosas causas pero también en condiciones fisiológicas^{6,18}.

Dentro de las células NK se distinguen dos subtipos según la densidad de expresión del marcador CD56: NK *bright* y NK *dim*^{3,8,9,19}. Las células NK *dim* se caracterizan por la expresión del receptor de la fracción Fc de las inmunoglobulinas (CD16) y la baja expresión del marcador CD56, mientras que las células NK *bright* se caracterizan por la expresión elevada del marcador CD56, la ausencia de CD16 y de receptores KIR. Estas diferencias fenotípicas les confieren diferencias en su funcionalidad. Así, las células NK *dim* son las responsables de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (CCDA), en inglés *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*, a través de CD16 y median la respuesta inmune innata inmediata frente a células tumorales o infectadas. Las células NK *bright* presentan propiedades inmunorreguladoras por la producción de citoquinas como interferón gamma (IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), entre otras, además de tener mayor capacidad de proliferación. De este modo, participan en la respuesta inflamatoria tardía (>16 horas) y constituyen la población mayoritaria en zonas de inflamación donde producen gran cantidad de citoquinas para favorecer el desarrollo de la respuesta inmune. En cambio, al carecer de receptores KIR, tienen menor capacidad citotóxica frente a células

tumorales, ya que no son capaces de reconocer la ausencia o disminución de expresión de HLA de clase I.

En individuos sanos, alrededor del 90% de las células NK de sangre periférica y del bazo son NK *dim* y la mayoría de las células NK de los ganglios linfáticos son NK *bright*³. Sin embargo, se ha demostrado que los pacientes con cáncer presentan un mayor porcentaje de células NK *bright* en sangre periférica²⁰.

La actividad de las células NK está regulada por señales de activación e inhibición que actúan a través de diversos receptores que reconocen ligandos en las células diana. En condiciones fisiológicas, existe un balance entre señales activadoras e inhibidoras para regular la función de las células NK⁸. Los receptores inhibidores identifican las células propias y transmiten señales para inducir tolerancia y evitar la autorreactividad.

Existen tres familias principales de receptores en las células NK: los receptores de citotoxicidad natural (NCR), los receptores tipo lectina C y los receptores KIR. La familia de los NCR incluye únicamente receptores activadores mientras que los lectina C y KIR incluyen receptores activadores e inhibidores²¹. En la figura 1 se esquematizan los principales receptores conocidos de las células NK.

La señal de activación es mediada principalmente a través del receptor NKG2D (receptor tipo lectina C)¹⁴, que se une a varios ligandos expresados en células sometidas a estrés o con daño en el ADN como MIC/A, MIC/B (proteína de cadena relacionada con el complejo principal de histocompatibilidad) y a las proteínas de unión a UL16 (ULBP 1-6). Otros receptores activadores se incluyen dentro de los NCR como NKp30, NKp46 y NKp44, que se unen a ligandos como B7-H6 (presente en células tumorales), BAT3, hemaglutinina y neuraminidasa (moléculas víricas). También son activadores el receptor DNAM-1 que es una molécula coestimuladora de adhesión, que se une a los ligandos CD112 o nectina 2 (expresado en situaciones de estrés celular) y CD155 (receptor de poliovirus), el receptor CD16 que media la CCDA y receptores KIR activadores, principalmente KIR2DS1 y KIR3DS1, que se unen a HLA-B y C respectivamente. Por tanto, estos receptores se unen a ligandos que se encuentran sobreexpresados en células tumorales o infectadas por virus. Por ello, las células NK juegan un importante papel en el control de infecciones virales, principalmente por citomegalovirus (CMV), herpesvirus e influenza^{22,23,24}. Estas células se expanden durante la infección y son capaces de generar células memoria que confieren mayor protección frente a reinfecciones.

La señal inhibidora es mediada principalmente a través de receptores KIR, los cuales reconocen moléculas HLA de clase I. Estos receptores KIR son los más

importantes desde el punto de vista clínico¹⁴. Son moléculas transmembrana que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se codifican en el cromosoma 19. Interactúan con HLA-Bw4, HLA-C1 y HLA-C2. Al encontrarse la expresión de HLA de clase I disminuida o ausente en las células tumorales, las células NK se activan y destruyen las células malignas. Otro receptor inhibidor relevante es NKG2A, perteneciente a los receptores tipo lectina C, que reconoce HLA-E y al unirse a éste inhibe la lisis de la célula tumoral.

La activación de las células NK tras la unión de los receptores activadores a sus respectivos ligandos sigue estando supeditada a las señales de inhibición recibida a través de los receptores inhibidores KIR, excepto en el caso de NKG2D cuya unión a sus ligandos es capaz de superar las señales inhibitoras proporcionadas por los receptores KIR.

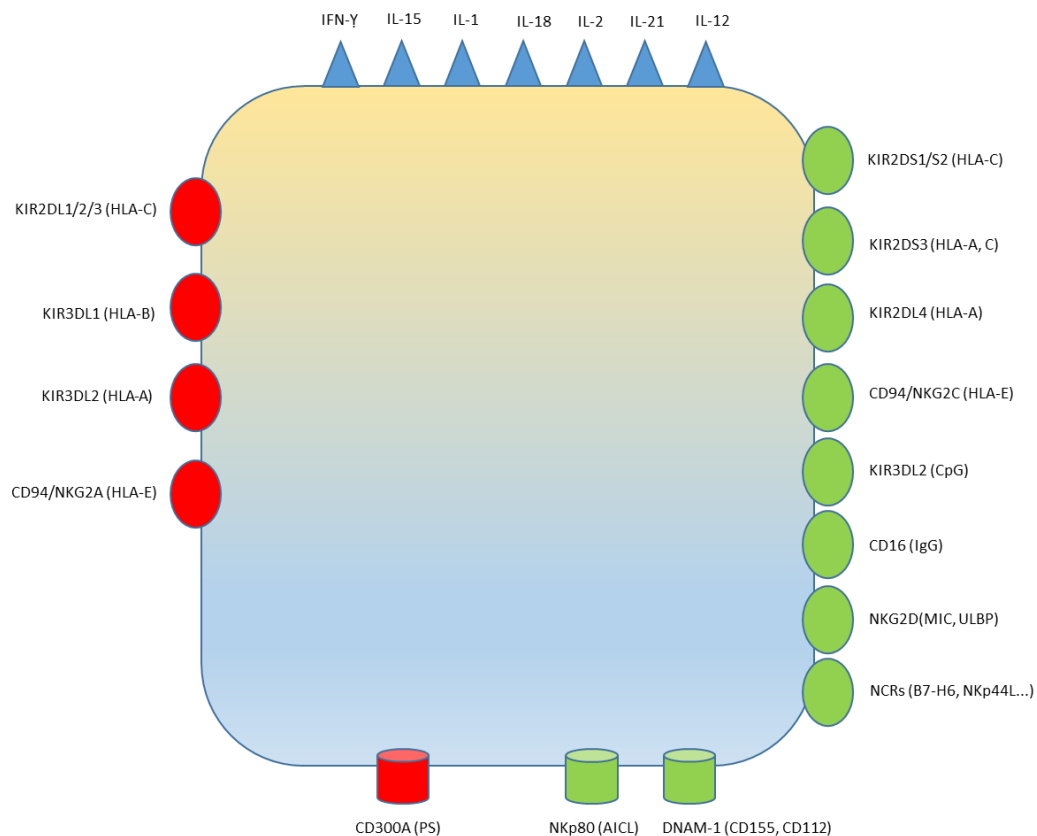


Figura 1: Principales receptores conocidos de las células NK y sus ligandos

En color verde se representan los receptores activadores y en color rojo los receptores inhibidores. En la parte superior se representan los receptores de citoquinas y en la parte inferior los correceptores. Entre paréntesis se muestran los ligandos de cada receptor⁶.

Las células NK son capaces de matar a las células diana por diversos mecanismos^{3,15,25}:

- 1) Por liberación de gránulos citoplasmáticos que contienen perforinas y granzimas, las cuales inducen apoptosis de las células tumorales.
- 2) Por apoptosis mediada por receptores: algunas células NK expresan factores de necrosis tumoral tales como el ligando de Fas (FasL) y TRAIL (del inglés *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), que se unen a sus respectivos receptores en la célula tumoral, induciendo apoptosis.
- 3) Por secreción de moléculas efectoras tales como IFN- γ , que inhibe la angiogénesis tumoral y estimula la inmunidad adaptativa.
- 4) Por el mecanismo de CCDA. Mediante unión a la fracción constante Fc de los anticuerpos, CD16 produce una señal activadora muy potente en la célula NK, que sobrepasa la señal inhibitoria sin necesidad de otras señales, para destruir la célula diana recubierta de anticuerpos. La especificidad de esta respuesta viene determinada por los linfocitos B (LB).
- 5) Actividad indirecta al actuar como reguladoras de células dendríticas, macrófagos, células endoteliales y LT, mediante la producción de citoquinas como IFN- γ e interleuquina-10 (IL-10). El IFN- γ induce la transformación de LT CD8+ en LT citotóxicos. Además, también son capaces de regular la producción de anticuerpos por LB.

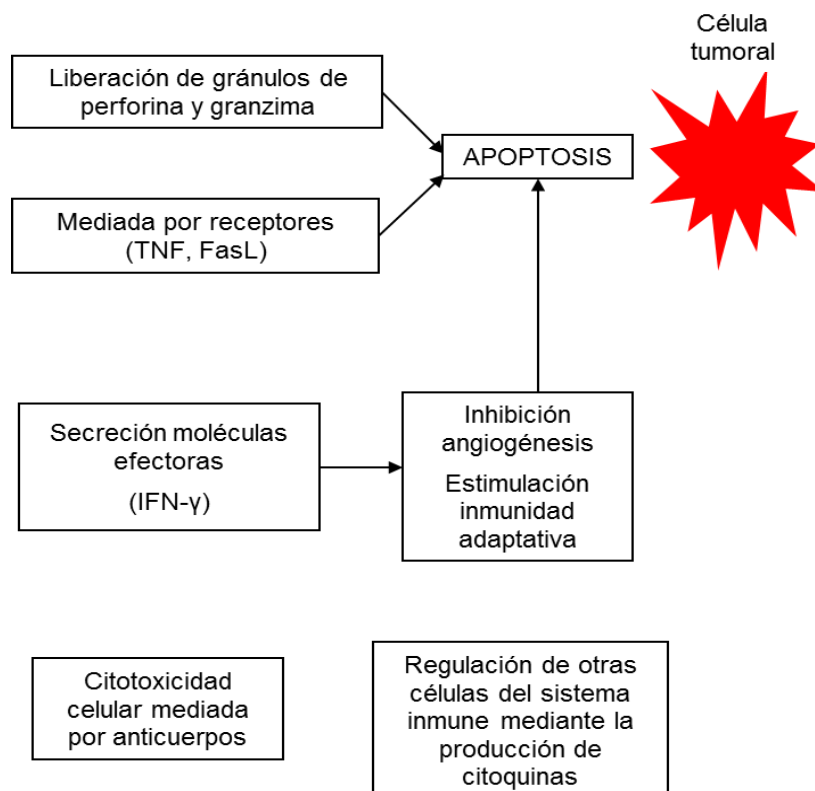


Figura 2: Mecanismos de citotoxicidad de las células NK

Durante su desarrollo, las células NK deben experimentar un proceso de maduración conocido como “educación” o “licenciamiento” para reconocer lo extraño y tolerar lo propio. Así, las señales de activación e inhibición alcanzan un equilibrio de forma que la cantidad de HLA-A, B y C que se expresa en las células sanas sea suficiente para inhibir la acción de las células NK²⁵.

La infiltración por células NK en tumores se ha asociado a mejor pronóstico en cáncer gástrico, colorrectal y de pulmón^{26,27,28}. Se han descrito dos mecanismos principales por los que las células NK lisan a las células tumorales^{25,29,30,31}:

- 1) Hipótesis “*induced-self*”: el estrés celular y el daño del ADN inducen la sobreexpresión de proteínas en la superficie de las células tumorales que actúan como ligandos para los receptores activadores de las células NK.
- 2) Hipótesis “*missing self*” o pérdida de lo propio: la expresión de HLA de clase I en la superficie de las células tumorales se encuentra reducido o suprimido como mecanismo de evasión a los LT. Las células NK son capaces de detectar esta ausencia de expresión.

2.- RECEPTORES KIR.

Los receptores KIR son moléculas transmembrana que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Reconocen específicamente moléculas HLA de clase I, incluyendo grupos de HLA-A, HLA-B y HLA-C. Existen dos tipos de receptores KIR funcionalmente distintos: inhibidores y activadores. Cada tipo tiene un dominio extracelular idéntico, por lo que se unen a ligandos idénticos. Sin embargo, por sus diferencias en los dominios transmembrana y citoplasmático, la respuesta que producen es distinta, inhibidora o activadora, según el tipo de receptor.

En cuanto a la nomenclatura, “2D” y “3D” hace referencia al número de dominios de inmunoglobulinas extracelulares, y las letras “L” o “S” hacen referencia al tamaño del dominio citoplasmático largo (KIR2DL y KIR3DL) o corto (KIR2DS y KIR3DS). El dominio citoplasmático largo genera una señal inhibidora a través de inmunorreceptores mediados por tirosina (ITIM, del inglés *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) mientras que el dominio corto genera una señal activadora a través de inmunorreceptores llamados ITAM (del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)³².

Respecto a los ligandos, HLA-C es el isotipo de HLA-I más implicado en la regulación de la función de las células NK. Los alelos HLA-Cw1, Cw3, Cw7 y

Cw8 (grupo 1 de HLA-C) son reconocidos por los receptores inhibidores KIR2DL2 y KIR2DL3 y por los receptores activadores KIR2DS2 y KIR2DS3. Por otro lado, los alelos HLA-Cw2, Cw4, Cw5 y Cw6 (grupo 2 de HLA-C) son reconocidos por los receptores KIR2DL1 y KIR2DS1. Parece que los receptores inhibidores tienen mayor afinidad por estos alelos que los receptores activadores, por lo que una célula NK que exprese ambos tipos de receptores, generalmente recibirá una señal inhibidora.

Los individuos homocigotos para alelos de HLA-C del grupo 2 generan solamente células NK con receptores KIR que reconocen alelos del grupo 2. Del mismo modo, los individuos homocigotos para los alelos de HLA-C del grupo 1, generan células NK con receptores KIR que reconocen alelos del grupo 1. Sin embargo, si un individuo expresa alelos de ambos grupos, producirá dos subtipos de células NK, cada una de las cuales expresará receptores KIR que reconozcan alelos diferentes. Si estas células NK se incuban con células que sólo expresan alelos de un grupo, como puede ocurrir en los donantes HLA no idénticos, fundamentalmente haploidénticos, se activarán los receptores KIR que reconocen el otro subgrupo de alelos y se producirá lisis³².

En la tabla 1 se recogen los distintos ligandos conocidos de los receptores KIR³².

Tabla 1: Principales receptores KIR y sus ligandos correspondientes

RECEPTOR KIR	LIGANDO
KIR2DL1 (CD158a)	Grupo 2 HLA-C Asn77Lys80 (w2,w4,w5,w6 y alelos relacionados)
KIR2DL2 (CD158b)	Grupo 1 HLA-C Ser77Asn80 (w1,w3,w7,w8 y alelos relacionados)
KIR2DL3 (CD158b)	Grupo 1 HLA-C Ser77Asn80 (w1,w3,w7,w8 y alelos relacionados)
KIR2DL5	Desconocido
KIR3DL1	HLA-Bw4
KIR3DL2	HLA-A3,-A11
KIR3DL7	Desconocido

2.1.- Haplotipos KIR.

La familia KIR se localiza en el cromosoma 19p13.4, consta de 17 genes (15 genes y 2 pseudogenes) con sus variantes alélicas, cada uno de los cuales codifica para un receptor diferente. Los receptores inhibidores KIR reconocen moléculas HLA de clase A, B y C, mostrando un polimorfismo similar al sistema HLA, si bien sus genes se segregan de forma independiente²⁵. Por tanto, cada individuo expresa un patrón diferente de receptores KIR.

Desde el punto de vista genético, se han descrito dos haplotipos para receptores KIR: KIR-A y KIR-B⁸.

El haplotipo KIR-A contiene solamente un receptor activador, KIR2DS4, mientras que el haplotipo KIR-B contiene dos o más receptores activadores.

La distribución de los haplotipos A y B varía según razas y localización geográfica⁸. Además, el contenido genético es altamente polimórfico, lo que determina que los receptores KIR tengan una afinidad variable por los ligandos HLA. El haplotipo KIR-A más común es: KIR3DL3-2DL3-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-2DS4-3DL2. Una variante menos frecuente carece de KIR2DP1 y de 2DL1. El haplotipo KIR-B contiene de forma característica más activadores KIR. Se caracteriza por presentar contenido más variable y la presencia de uno o más de 7 genes específicos B: KIR2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 2DL2, 2DL5 y 3DS1²⁵.

Se debe tener en cuenta que los receptores KIR se codifican en el cromosoma 19 mientras que el sistema HLA lo hace en el cromosoma 6, por lo que las dos familias se segregan de forma independiente. Por lo tanto, el tipaje HLA no se puede utilizar para predecir el haplotipo KIR^{6,25}.

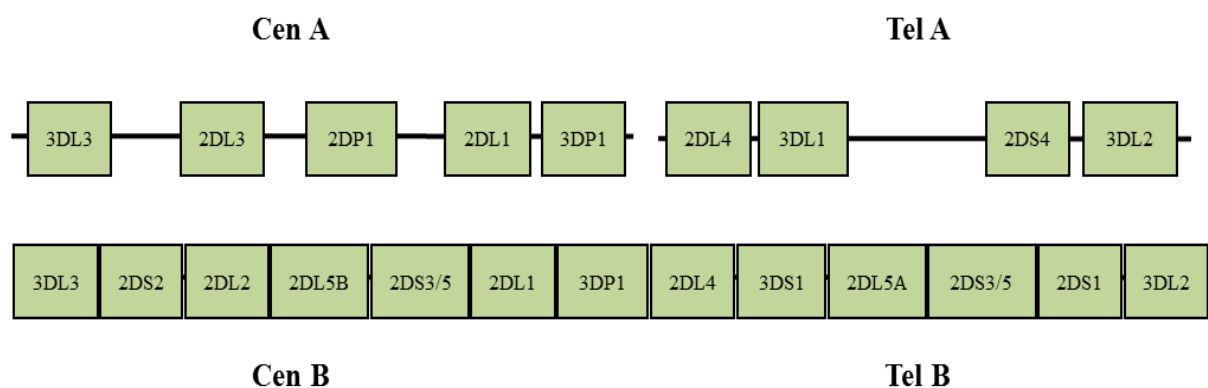


Figura 3: Haplotipos KIR-A y KIR-B

2.2.- “Score de Cooley”.

Con el objetivo de desarrollar una estrategia de selección de donantes, el grupo de la Dra. Cooley comparó la contribución de los genes centroméricos y teloméricos de los haplotipos KIR-A y KIR-B respecto al éxito del trasplante y observó que los genes del haplotipo KIR-B contribuyen a la mejoría de la supervivencia y la disminución del riesgo de recaída^{8,6,33,34,35}, en el caso del trasplante en pacientes adultos con LMA. Entre los individuos con haplotipo KIR-B puede establecerse el contenido en genes específicos B, lo que se conoce como “score de Cooley”.

Este grupo desarrolló una calculadora a la que se puede acceder a través de la página http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html. Permite introducir los genotipos de más de 5 potenciales donantes para clasificarlos en grupos según su contenido KIR-B. Estos grupos se denominan “Neutral”, “Better” y “Best”, y se relacionan con la protección frente a recaídas.

Todos los genotipos se comparan con una lista de genotipos predictores que se generan basándose en haplotipos KIR conocidos y se suplementan con genotipos adicionales que se detectan en distintos tipajes KIR.

El “score de Cooley”^{6,33} se calcula sumando la puntuación de las regiones centromérica y telomérica B y tiene un rango de 0-4 según la presencia en dichas regiones de los genes KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DS1 y KIR3DL1, como se muestra en las tablas 2 y 3:

Tablas 2 y 3: Cálculo del “score de Cooley”

Cen B		KIR2DL3	
		Positivo	Negativo
KIR2DL2	Positivo	1	2
	Negativo	0	No existe

Tel B		KIR3DL1	
		Positivo	Negativo
KIR3DS1	Positivo	1	2
	Negativo	0	Raro

3.- CARACTERÍSTICAS DE LAS CITOQUINAS IL-2 E IL-15.

3.1.- Características de la IL-2.

La citoquina IL-2 fue descrita por primera vez hace 42 años por el grupo de Morgan (1976)³⁶ como mediador del crecimiento y diferenciación de los LT. Ha servido como paradigma para el estudio de otras citoquinas por las características de su receptor, el cual comparte subunidades con otras citoquinas como la IL-15 o la IL-7.

Se produce tras la activación antigénica y juega un papel fundamental en la respuesta inmune.

Además de su potente acción como factor de crecimiento de LT, posee otras funciones como inducir proliferación de las células NK y aumentar su actividad citotóxica, además de promover la proliferación de los LB y la producción de anticuerpos por parte de los mismos. Por otro lado, es esencial para inducir apoptosis y de esta forma mantener la homeostasis celular. También participa en el desarrollo de LT reguladores. Por todo ello, IL-2 es esencial para la proliferación y diferenciación de los LT además de limitar potenciales reacciones autoinmunes.

Se trata de una citoquina de 15,5 kilodalton (kDa) que se produce fundamentalmente en los LT CD4+ tras la estimulación antigénica. Además, es producida en menor cantidad por los LT CD8+, las células NKT y las células dendríticas activadas³⁷.

La IL-2 actúa a través de receptores específicos formados por diversas combinaciones de las tres subunidades del receptor de IL-2: IL2R α (CD25), IL2R β (CD122) (que es común con el receptor de IL-15) e IL2R γ (CD132; compartido con IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21)³⁷.

La IL2R α está ausente o se expresa mínimamente en las células NK y LT basales, aumentando tras su estimulación con IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, TNF α y TGF- β .

IL2R β se expresa en múltiples poblaciones hematopoyéticas como las células NK, LT basales, monocitos y neutrófilos. IL-2 e IL-4, entre otras sustancias, aumentan su expresión³⁷.

La inmunoterapia con IL-2 ha sido utilizada durante varios años con la aprobación por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) en 1992 para el carcinoma renal metastásico y en 1998 para el melanoma metastásico. En estas enfermedades, se puede conseguir una tasa de remisión completa de 5-10% con un potencial de curación de hasta el 70% de los pacientes en los que se consiguió la remisión. Estos resultados podrían mejorarse empleando terapias coadyuvantes. También se ha utilizado en altas dosis en pacientes pediátricos con neuroblastoma de alto riesgo junto al anticuerpo monoclonal antiGD2. La limitación principal en el uso terapéutico de IL-2 es su toxicidad, que incluye síndrome de fuga capilar severo, fundamentalmente cuando se utiliza en dosis altas³⁷.

3.2.- Características de la IL-15.

La IL-15 es una citoquina proinflamatoria implicada en la memoria inmunológica, incluida la memoria propia. Fue descrita inicialmente como factor de crecimiento de los LT y descubierta simultáneamente por dos laboratorios en 1994. Comparte algunas propiedades con la IL-2 tales como las subunidades del receptor IL-2/15R β (CD122) y la cadena común γ (CD132) además de la vía de señalización JAK1/JAK3/STAT5. A pesar de estas similitudes, ambas citoquinas poseen distintas funciones *in vivo*. Además de estos receptores, cada citoquina posee receptores específicos. En el caso de la IL-15, su receptor específico es el IL-15R α , a través del cual realiza sus funciones principales^{38,39}.

La función más importante de la IL-15 es inducir la diferenciación y proliferación de los LT de memoria, las células NK y los LB. Además, mejora la actividad citotóxica de los LT CD8+, estimula la síntesis de las inmunoglobulinas por parte de los LB e induce la maduración de las células dendríticas. No se ha demostrado que estimule los LT reguladores, a diferencia de la IL-2^{38,39}. Por todo esto, la IL-15 es capaz de mejorar la inmunidad innata y adaptativa y ejercer actividad antitumoral.

La IL-15 es una glicoproteína de 14-15 kDa codificada en una región del cromosoma 4q31. El ARN mensajero (ARNm) de esta proteína se expresa en gran cantidad de tejidos tales como fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales, células nerviosas, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Aunque todas estas células expresan ARNm de IL-15, solamente expresan proteína IL-15 los monocitos, macrófagos y las células dendríticas por estimulación de IFN α o β y CD40 ligando. Esta estrecha regulación de su expresión es necesaria por su potente efecto inflamatorio y su capacidad para inducir la secreción de TNF α , IL-1 β , IFN- γ y otras citoquinas proinflamatorias que pueden asociarse con el desarrollo de enfermedades autoinmunes^{38,39}.

El receptor de la IL-15 está compuesto de una subunidad beta (IL2R/15R β), común con el receptor de IL-2, una subunidad gamma común con IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-21, y una subunidad alfa (IL15R α) que otorga especificidad a la IL-15. Esta subunidad es esencial para la sinapsis inmunológica con las células NK y los LT.

La IL-15 está involucrada en el desarrollo y mantenimiento de células efectoras que median los mecanismos de defensa del huésped, especialmente la inmunidad innata mediada por células NK. Además, la IL-15 induce la maduración y aumenta la capacidad de lisis de las células NK, y es esencial en su diferenciación a partir de los progenitores hematopoyéticos CD34+. Otro efecto de la IL-15 sobre las células NK es la inducción de otras citoquinas y quimioquinas, especialmente GM-CSF^{38,39}. La administración de IL-15 exógena puede favorecer de manera potencial, el desarrollo, la expansión y la supervivencia de células efectoras de la respuesta inmune, con efecto superior y menos tóxico al demostrado por IL-2 en el tratamiento de tumores refractarios, así como proteger frente a infecciones concomitantes. Recientemente además se ha descrito que el aumento de la citotoxicidad de las células NK por la IL-15 está condicionado por la expansión de clones de NK *dim*^{38,39}.

La IL-15 comparte con la IL-2 la función de estimular la proliferación de los LT y la proliferación y activación de las células NK. Sin embargo, a diferencia de la IL-2, necesaria para el mantenimiento de los LT reguladores, la IL-15 no muestra efecto relevante sobre los mismos. Por otro lado, mientras que la IL-2 juega un papel fundamental en inducir la apoptosis de los LT autorreactivos, la IL-15 actúa como un factor antiapoptótico para los LT³⁸.

Además, se han descrito otros efectos de la IL-15 sobre otros componentes del sistema inmune, tal como proteger a los neutrófilos frente a la apoptosis, modular la fagocitosis y estimular la secreción de IL-8. También actúa sobre los macrófagos incrementando la fagocitosis e induce la proliferación y diferenciación de los LB, estimulando la secreción de inmunoglobulinas^{38,39}.

La IL-15 también ha demostrado efectos sobre células no hematológicas como miocitos, adipocitos, células neurales y endoteliales. Tiene un efecto anabólico en el músculo y es capaz de estimular la angiogénesis e inducir crecimiento de las células gliales³⁸.

En los últimos años se han desarrollado distintos estudios preclínicos que utilizan IL-15 como inmunoterapia en el tratamiento del cáncer.

De este modo, la administración directa de IL-15 ha demostrado efecto antitumoral en varios estudios preclínicos realizados en ratones, en algunos

casos con incremento de la supervivencia, como en el estudio realizado por el Dr. Yu y colaboradores en 2010 en ratones afectos de cáncer de colon⁴⁰. También ha demostrado efectividad al ser administrada como vacuna en modelos preclínicos de tumores como en el ensayo del grupo del Dr. Steel en 2010 en cáncer de mama⁴¹.

También se han puesto en marcha distintos ensayos clínicos en humanos que utilizan IL-15 en el tratamiento del cáncer y como coadyuvante de vacunas para pacientes con infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)³⁸. El grupo del Dr. Miller (Universidad de Minnesota) ha publicado recientemente un ensayo fase I en el que se administró IL-15 recombinante por vía subcutánea a pacientes adultos con tumores sólidos avanzados. Se objetivó expansión de las células NK *bright* circulantes además de expansión de LT CD8+ en menor cantidad. No se observó respuesta tumoral si bien varios pacientes presentaron estabilización de la enfermedad⁴².

Por otro lado, la IL-15 está siendo evaluada en diferentes estudios como agente para estimular células *ex vivo* y está siendo producida en condiciones NCF, produciendo un aumento de la funcionalidad de células NK, LT CD8+, LT de memoria y células dendríticas cultivadas en su presencia³⁸.

A diferencia de la IL-2, la IL-15 no induce síndrome de fuga capilar, el cual supone un efecto adverso limitante de dosis en la utilización de IL-2 con fines terapéuticos.

La IL-15, como citoquina proinflamatoria, desempeña un papel importante en el desarrollo de inflamación y enfermedades autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, artritis reumatoide, sarcoidosis, etc. En pacientes con estas patologías se ha demostrado una disregulación en la expresión de la IL-15. Por ello, teóricamente, se pueden desarrollar fenómenos autoinmunes en pacientes que reciban tratamiento con IL-15, si bien de momento no se ha demostrado positivización de marcadores de autoinmunidad. También se ha descrito el desarrollo de leucemia T en ratones transgénicos. Parece que el riesgo de desarrollo de estas enfermedades al utilizar IL-15 de forma terapéutica es mínimo³⁸.

En los distintos estudios realizados en animales, no se han descrito efectos adversos clínico-analíticos significativos de ningún tipo salvo casos aislados de neutropenia transitoria, que se recupera espontáneamente a las 72 horas de suspender el tratamiento³⁸.

En humanos, el grupo del Dr. Miller observó tras la administración de IL-15 recombinante subcutánea, un caso de pancreatitis y un caso de dolor torácico con hipotensión y elevación de troponina, siendo la dosis máxima tolerada 2

$\mu\text{g/kg/día}^{42}$. El mismo grupo, en un trabajo pendiente de publicación, ha observado neurotoxicidad tras la administración de dosis elevadas de IL-15 subcutánea, lo que podría ser un factor limitante de dosis.

3.3.- Diferencias principales entre IL-2 e IL-15.

Las citoquinas IL-2 e IL-15 comparten algunas propiedades como las subunidades del receptor IL-2/15R β (CD122) y la cadena común γ (CD132) además de la vía de señalización JAK1/JAK3/STAT5. Por ello, comparten también algunas funciones como la estimulación de la proliferación de LT, la producción de LT citotóxicos, la estimulación de la síntesis de inmunoglobulinas por parte de los LB y la generación y mantenimiento de las células NK. Sin embargo, en diversas respuestas inmunes adaptativas, ambas citoquinas poseen distintas y a veces opuestas funciones.

A diferencia de IL-2, IL-15 no participa en el mantenimiento de los LT reguladores que pueden atenuar la respuesta inmune antitumoral. IL-2 inhibe las respuestas de los LT activando la apoptosis de los LT CD8 $^{+}$ efectores y promoviendo las células T reguladoras, mientras que la IL-15 tiene actividad antiapoptótica y se requiere para el inicio de la activación de LT y la supervivencia de células de memoria.

Por otro lado, en distintos estudios preclínicos se han observado diferencias en cuanto a su toxicidad, con un mayor riesgo de síndrome de fuga capilar en el caso de IL-2, prácticamente inexistente al utilizar IL-15.

4.- INMUNOTERAPIA CON CÉLULAS NK.

4.1.- Antecedentes históricos: células LAK.

En 1980, el grupo del profesor Rosenberg demostró que la incubación de linfocitos humanos o de ratón en medios con IL-2 resultaba en la generación de células linfoides capaces de lisar células tumorales. Estas células se llamaron células “*lymphocyte activated killers*” (LAK). Representan una estirpe celular diferente a las células NK y a los LT citotóxicos^{43,44}.

Las células LAK demostraron actividad antitumoral al ser inyectadas *in vivo*, sin lisar células sanas. Se realizaron estudios en ratones donde se observó que podían producir regresión de metástasis pulmonares de sarcomas y de melanoma.

Posteriormente, en 1985, el mismo grupo estudió la producción de células LAK *in vivo* mediante la inyección en ratones de dosis crecientes de IL-2^{45,46}. Sólo se demostró una actividad antitumoral limitada (20% de respuestas, similar a la administración de altas dosis de IL-2), además de severos efectos adversos como síndrome de fuga capilar.

La mayoría de investigadores considera que la actividad citotóxica de las células LAK representa la actividad de las células NK activadas con IL-2, si bien estos productos contenían LT⁶.

4.2.- Células NK autólogas.

Los primeros ensayos clínicos en humanos utilizando las propiedades antitumorales de las células NK se basaron en la selección positiva de células CD56+ a partir de aféresis del paciente, su infusión y la posterior administración sistémica de citoquinas como IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 e IFN tipo I para estimular su proliferación *in vivo*, fundamentalmente IL-2³.

Sin embargo, existen tres importantes limitaciones en este método: 1) la toxicidad de la administración sistémica de citoquinas (síndrome de fuga capilar) e inducción de apoptosis de células NK; 2) la expansión de LT reguladores y 3) las células NK autólogas *in vivo* pueden inhibirse al reconocer HLA de clase I en el paciente³.

Mediante el uso de anticuerpos antiKIR, que bloquean la expresión de receptores KIR inhibidores, puede incrementarse la actividad citotóxica celular. Esta es la base de un ensayo fase I en pacientes con LMA⁴⁷.

Los ensayos clínicos basados en la utilización de células NK autólogas incluyen pacientes con glioma⁴⁸, carcinoma renal metastásico, melanoma⁴⁹ y mieloma múltiple⁵⁰. La transferencia de células NK autólogas expandidas y activadas *ex vivo* ha sido evaluada clínicamente encontrando una mejoría de la respuesta clínica sin efectos adversos severos en estos pacientes. Sin embargo, no son totalmente efectivas debido a que son inhibidas por las moléculas HLA clase I del paciente.

Otros activadores de células NK tales como IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21 están siendo probados con éxito en modelos preclínicos como parte de estrategias vacunales. El uso de IL-15 junto a hidrocortisona, activa y expande *ex vivo* a las células NK y esas células son efectivas *in vivo* en modelos murinos de tumores sólidos⁵¹.

4.3.- Células NK alogénicas.

Tras la caracterización de los receptores KIR, la inmunoterapia basada en células NK se centralizó en la utilización de NK alogénicas de donantes sanos. De este modo se evita la supresión de la citotoxicidad inducida por el tumor³.

El primer ensayo clínico que demostró la seguridad de la infusión de células NK alogénicas expandidas *ex vivo*, fuera del contexto del TPH, fue publicado en 2005 por el equipo del Dr. Miller, de la Universidad de Minnesota^{52,46,8}. Incluyó 43 pacientes con carcinoma renal metastásico, melanoma metastásico y LMA de alto riesgo. Se obtuvieron células NK por aféresis de sangre periférica de donantes haploidenticos, se realizó purgado de LT y se incubaron con altas dosis de IL-2. Previo a la infusión de NK, los pacientes recibieron tres tipos de regímenes de acondicionamiento: altas dosis de ciclofosfamida y fludarabina (Flu/Cy), bajas dosis de ciclofosfamida y metilprednisolona o fludarabina en monoterapia. Tras la infusión, los pacientes recibieron diariamente IL-2 (1,75 millones de unidades/m²) durante 14 días. La expansión de células NK infundidas sólo se consiguió en los pacientes que habían recibido altas dosis de Flu/Cy. Se consiguió respuesta en el 30% de los pacientes con leucemia mieloide, que alcanzaron remisión completa, si bien esta remisión no fue duradera y posteriormente recayeron. No se objetivó ningún caso de EICR.

Posteriormente se realizó un protocolo modificado, añadiendo al régimen Flu/Cy, irradiación corporal total (ICT) (400 cGy) seguida de TPH, con el fin de inmunodeprimir aún más al paciente y crear espacio para la expansión de las células NK infundidas. De este modo, se observó remisión en el 66% de los pacientes con leucemia mieloide, sugiriendo que las células NK por sí mismas tienen un efecto antileucemia.

Otros ensayos clínicos realizados obtuvieron resultados variados. En 2008 el grupo del Dr. Shi publicó un estudio en el que se infundieron células NK haploidénticas con disparidad KIR-HLA en 10 pacientes con mieloma múltiple en recaída; 5 pacientes alcanzaron remisión completa⁵³. El grupo de Bachanova en 2010 trató a 6 pacientes con linfoma no Hodgkin con infusión de células NK haploidénticas encontrando escasa expansión de las mismas⁵⁴.

Las células NK alogénicas con disparidad KIR-HLA han demostrado importante actividad antitumoral, tanto en el tratamiento de leucemias como de tumores sólidos. Además, han demostrado ser seguras, con toxicidad mínima⁴⁶. Se han utilizado con éxito para tratar varios tipos de tumores tales como melanoma metastásico, carcinoma renal, linfoma de Hodgkin y leucemia mieloide de mal pronóstico.

En el contexto del TPH de donante haploidéntico, se han desarrollado diferentes algoritmos para asegurar la elección del mejor donante, basados en la alorreactividad de las células NK^{25,33}.

Otras estrategias que se están investigando en la actualidad incluyen la infusión de células NK alogénicas con disparidad KIR-ligando como régimen de acondicionamiento previo al TPH (NCT00402558) y la infusión de células NK para prevenir la recaída o como terapia para la enfermedad mínima residual en pacientes tras el TPH.

También se han desarrollado estrategias terapéuticas para aumentar la acción antitumoral de las células NK por la vía CCDA. Los anticuerpos monoclonales frente a células tumorales tales como anti-CD20 (rituximab) y anti-HER2 (trastuzumab) se pueden modificar estructuralmente para aumentar la acción de las células NK a través de esta vía. Este efecto además puede ser potenciado con la administración de citoquinas como IL-12 que incrementa la actividad de las células NK cuando se usa en combinación con anti-HER2^{3,55}.

4.4.- Líneas celulares NK (expansión *ex vivo*).

Se han desarrollado diversas líneas celulares para el tratamiento de varios tipos de tumores. Estas células se expanden *ex vivo* por diversos mecanismos y posteriormente se transfieren al paciente. Entre ellas, NK92, KHYG-1, NKL y NKG han demostrado eficacia antitumoral.

NK92 se ha demostrado segura y eficaz, estando aprobada por la FDA para su ensayo en pacientes con melanoma metastásico y carcinoma renal. Es actualmente la única línea celular utilizada en ensayos clínicos. Son células tumorales modificadas e irradiadas para prevenir su proliferación *in vivo*, con mayor citotoxicidad que las células NK habituales. Fueron obtenidas en 1992

de un paciente de 50 años con linfoma de células NK. Se caracterizan por poseer diversos receptores activadores y no expresar receptores KIR^{3,9,55}.

Una de sus ventajas es que pueden ser fácilmente mantenidas *in vitro* y expandidas bajo condiciones NCF para inmunoterapia. Además, su eficacia antitumoral puede ser mejorada mediante manipulación genética para actuar frente a una diana específica o bien para que expresen un gen de control celular que evite la necesidad de irradiación de las células^{3,55}.

Varios ensayos clínicos han utilizado esta línea celular. Entre los trabajos publicados se encuentran el del grupo del Dr. Arai (Chicago, EEUU), en pacientes con melanoma y carcinoma renal metastásico⁵⁶ y el del grupo de Williams (Toronto, Canadá) que incluye pacientes con tumores hematológicos en recaída tras trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos⁵⁷. Se ha observado una buena tolerancia al tratamiento, con algún caso de respuesta parcial.

Entre las limitaciones principales para la utilización de estas líneas celulares destacan los costes y la necesidad de irradiación, además de la necesidad de acondicionamiento para evitar el rechazo. Además, la infusión de líneas celulares alogénicas podría inducir las respuestas de los linfocitos T y B, limitando la persistencia *in vivo*, lo que haría necesarias múltiples infusiones para observar efectos clínicos^{3,55}.

4.5.- Células NK modificadas genéticamente.

Con el objetivo de mejorar la interacción entre células NK y células tumorales, pueden realizarse diversas modificaciones genéticas en las células NK que permitan por ejemplo sobreexpresar receptores activadores, inhibir receptores inhibidores o expresar citoquinas transgénicas. Modificando genes como los de IL-2, IL-12 e IL-15, se puede incrementar el ratio de proliferación de las células NK, su supervivencia y su actividad antitumoral *in vivo*. Sin embargo, todavía estas técnicas son limitadas^{3,55}.

Por otro lado, para aumentar la citotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* se pueden utilizar anticuerpos biespecíficos o trispecíficos (BiKEs o TriKEs) que unen las células NK a las células tumorales^{8,58-61} o transferir genes a las células NK de receptores quiméricos de antígenos específicos tumorales (CARs) de forma análoga a la terapia con CART19 (CARs en LT frente a CD19), la cual tiene resultados prometedores en cuanto a seguridad y eficacia en pacientes con LLA refractaria o en recaída en estudios que incluyen pacientes adultos y en edad pediátrica^{62,63}.

5.- FUENTES DE CÉLULAS NK PARA LA PRÁCTICA CLÍNICA.

Las células NK se pueden obtener de diversas fuentes: sangre periférica, médula ósea, cordón umbilical y células embrionarias. De ellos, la obtención mediante leucoaféresis de células mononucleares de sangre periférica supone la fuente más utilizada en la práctica. El objetivo de estos procedimientos es obtener un producto altamente purificado de células NK con mínima contaminación por LT para conseguir el mayor efecto antitumoral sin desarrollo de EICR.

5.1.- Cordón umbilical.

Se pueden seleccionar células CD34+ de esta fuente utilizando el sistema CliniMACS®. Las células NK derivadas de estas células CD34+ son generadas en medios celulares de cultivo estáticos o en un biorreactor automático. La producción a gran escala por estos métodos fue utilizada en un ensayo fase I con pacientes ancianos con LMA⁶⁴. Las células obtenidas de este modo expresan altos niveles del receptor NKG2D, siendo así eficaces contra las células leucémicas.

La sangre del cordón umbilical presenta algunas ventajas, como el alto contenido en células NK y el menor riesgo de EICR debido a la inmadurez de sus LT. Sin embargo, las células NK derivadas de cordón presentan algunas desventajas como su fenotipo inmaduro (determinado por una mayor expresión de receptores inhibidores como NKG2A y una menor expresión de receptores KIR), o una unión menos afín con las células diana, debida a una menor expresión de moléculas de adhesión^{3,9,31}. Recientemente, la producción a gran escala de células NK a partir de cordón umbilical se ha realizado a partir de unidades criopreservadas de cordón, cocultivadas con la línea K562 modificada genéticamente para expresar en su superficie IL-21, 41BB, CD64 y CD86. Estas células NK así cultivadas son capaces de expandirse y de formar sinapsis inmunológicas funcionales, siendo activas frente a diferentes líneas de mieloma múltiple. Múltiples ensayos clínicos fase I/II están probando la viabilidad y la eficacia de estas células NK de cordón para diversas neoplasias hematológicas (NCT01619761, NCT01729091, NCT01914263, NCT02280525).

5.2.- Médula ósea/células embrionarias.

Las células progenitoras hematopoyéticas CD34+, derivadas de la médula ósea, se pueden cultivar con IL-2 o IL-15 solos o en combinación con otros factores de crecimiento hematopoyéticos como ligando c-kit, para producir células NK³.

Recientemente, se ha descrito la producción de células NK a partir de células madre embrionarias a través de un método de cultivo en dos pasos³¹. Las

células así obtenidas poseen la capacidad de lisar células tumorales por citotoxicidad directa y dependiente de anticuerpos, y exhiben un fenotipo maduro de NK, con expresión de KIR y de una gran variedad de moléculas efectoras, de forma que han demostrado ser más efectivas que las células NK derivadas de cordón umbilical en un modelo animal. En el futuro, se podrían modificar genéticamente estas células para expresar receptores quiméricos dirigidos a antígenos expresados en las células tumorales y aumentar así su efectividad.

5.3.- Sangre periférica.

Se han desarrollado varios métodos de expansión *ex vivo* de células NK desde sangre periférica bajo condiciones NCF, algunos de los cuales se describen en el apartado 6³.

6.- MANUFACTURACIÓN DE CÉLULAS NK PARA USO CLÍNICO.

Para la utilización de células NK en inmunoterapia, es necesario obtener un número suficiente de células NK funcionales. Se obtienen de donantes sanos o de los propios pacientes.

Se han descrito varios métodos de expansión *ex vivo* de células NK para su posterior utilización en la práctica clínica. Para estimular la proliferación celular se pueden utilizar células “*feeder*” (alimentadoras) irradiadas como células mononucleares de sangre periférica o células linfoblásticas transformadas por el virus Epstein-Barr, genéticamente modificadas (K562)⁶⁵, en presencia de OKT3 (muromonab-CD3) e IL-2⁶⁶. Otros métodos de expansión utilizan medios de cultivo con citoquinas como IL-15.

6.1.- Selección inmunomagnética de células NK.

Las células NK se obtienen por leucoaféresis de sangre periférica en un sistema aséptico cerrado, habitualmente sin estimulación con factores de crecimiento, ya que éstos tienen un efecto negativo sobre la capacidad de activación y proliferación de las células NK. El proceso de selección se realiza mediante selección inmunomagnética, en dos pasos secuenciales: primero purgado de LT (CD3+) y posterior selección de células NK (CD56+). Para ello se utiliza el sistema CliniMACS®. Tras el purgado de LT, el producto restante es enriquecido utilizando el reactivo CD56 para aumentar la concentración de células NK frente a LB, células CD34+ y células dendríticas^{67,68}.

Este producto celular enriquecido en células NK puede ser infundido sin ninguna otra manipulación o tras su expansión con IL-2 o con otras citoquinas como IL-15 en medios de cultivo o en biorreactores.

6.2.- Sistema de activación y expansión de células NK.

El grupo del Dr. Dario Campana en 2009 desarrolló un método de expansión y activación de células NK (NKAЕ)^{68,69}, utilizando la línea celular leucémica K562 modificada genéticamente para expresar en su membrana IL-15 y el ligando CD137 (41BB), que es una potente molécula coestimuladora (línea K562-mb15-41BBL). Estas células carecen de HLA en su superficie y actúan como presentadoras de antígeno. Su cocultivo con células mononucleares en presencia de IL-2 produce expansión y activación de células NK, con incremento de su citotoxicidad. Se ha desarrollado un banco celular para su producción a gran escala bajo condiciones NCF.

Las células mononucleares se obtienen de sangre periférica de donantes sanos o del paciente mediante leucoaféresis. En el caso de células alogénicas, se puede realizar posterior selección de NK por sistema CliniMACS®, con purgado de LT.

Cuando las células mononucleares de donantes sanos o de pacientes con leucemia se someten a expansión con el método NKAЕ, la mediana de CD56+CD3- obtenida a los siete días es superior a la obtenida tras estimulación con IL-2, IL-12, IL-15 e IL-21. Además, la expansión de LT es escasa.

Este grupo demostró además que las NKAЕ presentan un perfil de expresión genética distinto a las células NK no estimuladas y a las estimuladas con IL-2. Los genes implicados incluyen codificación de citoquinas y sus receptores, moléculas de adhesión y moléculas implicadas en la estimulación de LT. Asimismo se estudió la expresión de receptores como NKG2D, encontrando una mayor expresión en las NKAЕ.

Por otro lado, existe una mejoría de la citotoxicidad y potencia de NKAЕ respecto a las células NK no estimuladas y NK estimuladas con IL-2 cuando se enfrentan a células leucémicas *ex vivo*, independientemente del ratio.

En los estudios *in vivo* realizados por este grupo con ratones inmunodeficientes⁶⁸ a los que previamente se les había inyectado células leucémicas, las células NKAЕ administradas por vía intravenosa se detectaron en sangre periférica a los 4 días, representando el $0,78 \pm 0,52\%$ de las células mononucleares, con descenso en los niveles en el día +10 a menos de 0,1%, siendo indetectables posteriormente. Sin embargo, cuando la administración de NKAЕ se acompañó de administración intraperitoneal de IL-2 (25.000 UI al día durante una semana y después cada 48 horas en las semanas siguientes), el porcentaje de células NK detectadas fue mucho mayor ($6,2 \pm 4,1\%$ de las células mononucleares en el día +4), siendo detectables hasta el día +38. Se

observó una supresión del crecimiento de las células leucémicas y/o una disminución de la carga tumoral en los ratones con NKAЕ detectables, aunque eventualmente el crecimiento progresó.

Por tanto, las células K562-mb15-41BBL inducen proliferación específica de células NK en donantes sanos y en pacientes con leucemia aguda en tratamiento. La expresión génica de las NKAЕ es diferente respecto a las NK no estimuladas y a las estimuladas con IL-2, tanto en genes asociados a la proliferación celular como en moléculas que regulan su función. Además presentan citotoxicidad importante frente a células leucémicas mieloides. Como ventaja adicional, los LT residuales al final del cultivo son prácticamente inexistentes, lo que evita el riesgo de EICR.

El grupo del Dr. Dean Lee posteriormente desarrolló un método de expansión similar con la línea K562-41BBL, con expresión de IL-21 en lugar de IL-15. Esta línea presenta como ventaja que no muestra senescencia replicativa ni acortamiento telomérico, lo que mejoraría su capacidad de expansión *in vivo*^{70,71}.

6.3.- Método de estimulación con IL-15 (NK-IL15).

El grupo del Dr. Pérez-Martínez, en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (Madrid), desarrolló en 2012 la estimulación de células NK con IL-15 *ex vivo*²⁰.

Las células NK se aislaron mediante sistema CliniMACS® de la sangre periférica de pacientes pediátricos con tumores sólidos refractarios y de controles sanos.

La actividad citotóxica *ex vivo* se determinó mediante cocultivo celular de las células NK de los pacientes y de los controles sanos con la línea celular K562. Se demostró que la citotoxicidad de los enfermos respecto a los controles sanos estaba disminuida²⁰. Sin embargo, tras estimulación diaria con IL-15 esta actividad se normalizaba.

Por otro lado, en el mismo trabajo se desarrolló un modelo murino de neuroblastoma refractario, observando que la carga tumoral disminuía en los ratones que recibieron tratamiento con NK-IL15²⁰.

Por tanto, se concluyó que la estimulación con IL-15 mejora la citotoxicidad *ex vivo* y es capaz de disminuir la carga tumoral *in vivo*.

7.- SELECCIÓN DE DONANTE HAPLOIDÉNTICO.

El objetivo general es la elección de un donante cuyas células NK produzcan un mayor efecto injerto contra leucemia sin riesgo de EICR. En el TPH haploidéntico, la alorreactividad es mediada principalmente a través de las células NK por los receptores inhibidores KIR, de forma que las células NK del donante pueden atacar a las células hematopoyéticas del receptor cuando éstas carecen del ligando para el correspondiente receptor inhibidor KIR^{8,15}. De esta forma, las células NK actúan como mediadoras de un potente efecto injerto contra leucemia que produce una disminución del riesgo de recaída demostrado en pacientes adultos con LMA, así como en pacientes pediátricos con LLA sometidos a TPH haploidéntico con purgado de LT.

La importancia de la selección del donante en las terapias basadas en células NK fue documentada por primera vez en el año 2002 por el grupo de la Dra. Ruggeri¹⁰, que demostró que la alorreactividad de las células NK disminuía el rechazo y mejoraba el prendimiento celular, además de producir efecto injerto contra leucemia. La alorreactividad de las células NK se determinó mediante el análisis de los ligandos KIR. El objetivo es la elección de un donante con un ligando KIR que falte en el receptor para así activar la función de las células NK y producir un efecto injerto contra leucemia. Actualmente para ello se utiliza el “*score de Cooley*”.

8.- SITUACION ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN CON CÉLULAS NK.

En la fecha de redacción de esta tesis (julio 2018) se encuentran registrados en Clinicaltrials.gov, 799 ensayos clínicos a nivel mundial que utilizan células NK como inmunoterapia adoptiva para tratamiento de diversas enfermedades neoplásicas, tanto hematológicas como tumores sólidos. La mayoría de ellos sólo incluyen pacientes adultos. Aproximadamente 100 de estos ensayos se realizan en población pediátrica. En la tabla 4 se resumen algunos de los que ya exponen resultados.

Tabla 4: Situación actual de la investigación con células NK

Identificación	Nombre del ensayo	Tratamiento administrado	Resultados
NCT00582816. Kenneth DeSantes. Fase I-II	Trasplante haploidéntico con acondicionamiento de intensidad reducida asociado a infusión post-trasplante de células NK para pacientes pediátricos con leucemia aguda y tumores sólidos de alto riesgo.	Metilprednisolona, globulina antitimocítica (ATG), ciclosporina, Flu, melfalán, tiotepa y rituximab + TPH haploidéntico + infusión células NK.	6 pacientes. 3 casos de EICR grado III cutáneo, 2 EICR grado IV gastrointestinal, 1 EICR grado III gastrointestinal, 2 fallos primarios del injerto y 1 fallo tardío. 1 paciente falleció antes del día +100.
NCT00698009. Susan S. Kelly. Fase II	Análisis de la infusión de células NK haploidénticas en pacientes con neuroblastoma refractario o en recaída.	Flu/Cy + infusión de células NK + bajas dosis de IL-2.	1 paciente (retirada voluntaria). Neutropenia febril.
NCT00941928. Anna Franklin. Fase II	Infusión de células NK haploidénticas en combinación con Epratuzumab y bajas dosis de IL-2 para el tratamiento de LAL en recaída.	Flu/Cy + Epratuzumab (360 mg/m ²) en los días -4, -1, +3, +6, +10, +13 y +17.	2 pacientes. Ninguno completó el tratamiento (1 progresión, 1 retirada voluntaria).
NCT00145626. Brandon Triplett. Fase II	TPH HLA no idéntico e infusión de células NK en niños < 2 años con tumores hematológicos de alto riesgo.	Cy, Flu, tiotepa, melfalán y OKT3 + TPH haploidéntico con purgado de LT + infusión de células NK en el día +7.	14 pacientes. Dosis de células NK: 38,9 x 10 ⁶ /kg (9,8- 102,5). Supervivencia 50% al año. 3 pacientes fallecieron por complicaciones del TPH. No EICR severo, 1 caso de EICR crónico limitado.
NCT00526292. Katherine Hsu y Ann Alice Jakubowski. Fase II	Infusión de células NK haploidénticas para el tratamiento de leucemia refractaria/recaída tras un TPH alogénico.	Flu/Cy + infusión de células NK.	6 pacientes (3 <18 años). 1 paciente remisión completa y 5 progresaron.

Identificación	Nombre del ensayo	Tratamiento administrado	Resultados
NCT01106950. Jeffrey S. Miller. Fase II	Infusión de células NK haploidénticas para el tratamiento de LMA refractaria o en recaída.	Flu, Cy y denileukina diftotox + infusión de células NK + IL-2.	15 pacientes (4 <18 años). 27 expansiones exitosas (células NK circulantes >100/μL a los 14 días). 53% remisión completa 4 semanas tras la última dosis. Supervivencia libre de enfermedad: 33% a los 6 meses.
NCT00871689. Michael R. Verneris. Fase II	Infusión de células NK haploidénticas y trasplante de cordón umbilical con doble purgado de LT para el tratamiento de LMA refractaria	Flu/Cy e ICT + infusión de cordón umbilical + IL-2 (total 12 dosis).	2 pacientes. 1 paciente remisión en el día +100,falleció por leucoencefalopatía 1 paciente falleció por fallo de injerto y recidiva de enfermedad de base.
NCT00187096. Jeffrey E. Rubnitz. Fase II	Estudio piloto de la infusión de células NK haploidénticas para pacientes con LMA.	Desde el día -1 se administra IL-2 hasta completar 2 semanas. Los pacientes se dividieron en 2 grupos: a. Grupo 1 (LMA en remisión completa): Flu/Cy b. Grupo 2 (LMA refractaria o en recaída o con aumento de enfermedad mínima residual). i. Grupo 2A: Flu/Cy ii. Grupo 2B: clofarabina +etopósido+ Cy.	25 pacientes 16 pacientes presentaron toxicidades grado 3-4. Duración del injerto de células NK: 10 días. Pico de quimerismo alcanzado 7%. Células NK del donante detectables en el día +28: 29% (7-30%). Supervivencia a los 2 años: 100%, 0% y 45% en cada grupo respectivamente

Identificación	Nombre del ensayo	Tratamiento administrado	Resultados
NCT02259348. Brandon Triplett. Fase II	Infusión de células NK haploidénticas como parte del acondicionamiento previo al TPH para el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas en recaída o refractarias.	Flu/Cy + IL-2 + células NK + ATG, rituximab, tiotepa y melfalán + TPH con purgado de LT y de CD45RA en el día 1.G-CSF desde el día +6.	6 pacientes. 100% injerto de neutrófilos el día +42. 2 pacientes recaída un año después. 3 pacientes EICR agudo grado III. 1 paciente EICR agudo grado IV No hubo muertes relacionadas con complicaciones del TPH. 2 pacientes sobrevivieron sin enfermedad a los 12 meses del tratamiento.
NCT01621477. Brandon Triplett. Fase II	TPH haploidéntico con células NK en pacientes con enfermedades hematológicas malignas refractarias o en recaída tras un TPH.	Clofarabina, citarabina, busulfán, plerixafor, ciclofosfamida, ATG de conejo + TPH	17 pacientes 7 pacientes estaban vivos al año del TPH, 4 de ellos libres de enfermedad. 10 pacientes recaída antes del año. 8 pacientes desarrollaron EICR (3 grado III y 1 grado IV). 2 muertes relacionadas con el TPH a los 100 días.

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

A pesar de la mejoría en el pronóstico de los pacientes pediátricos con cáncer, todavía la recaída o la refractariedad a los tratamientos convencionales constituyen las causas más importantes de mortalidad, con índices de supervivencia bajos a largo plazo. En el momento actual, la investigación en el área de la inmunología del cáncer, sugiere que algunas terapias celulares podrían tener un papel importante en el reconocimiento tumoral y en su eliminación.

La rápida actividad citotóxica de las células NK respetando las células sanas, la posibilidad de expandirlas y manipularlas para su uso clínico en humanos, y la posibilidad de combinarlas con otros tratamientos como quimioterapia, radioterapia u otras inmunoterapias, hacen de estas células una poderosa herramienta terapéutica a desarrollar, con un perfil de seguridad muy alto.

Entre las limitaciones para su uso generalizado en la práctica clínica destacan la necesidad de expandirlas para obtener un número suficiente, la dificultad de las técnicas para su manufacturación y la necesidad de hacerlo en condiciones NCF para uso humano, lo que conlleva costes y necesidad de laboratorios especialmente diseñados para ello.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS.

1. Las células NK procedentes de donantes sanos haploidénticos pueden ser activadas y expandidas *ex vivo* en condiciones NCF.
2. Con los métodos de expansión y activación *ex vivo* se pueden obtener un número suficiente de células NK para su uso clínico.
3. La infusión en pacientes pediátricos con tumores sólidos o leucemias refractarias o en recaída es segura y podría tener un efecto terapéutico.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral son:

1.-Describir los procesos de producción de células NK para uso clínico a partir de sangre periférica de donantes sanos:

- a) Células Natural Killer activadas *ex vivo* con IL-15 (NK-IL15).
- b) Células Natural Killer activadas y expandidas *ex vivo* (NKAE).

2.-Comparar las características morfológicas y funcionales del producto final:

- a) NK-IL15.
- b) NKAE.

3.-Describir la utilización de ambos productos en tres ensayos clínicos:

- a) “Trasplante haploidéntico e infusión de células NK estimuladas con IL-15 en pacientes pediátricos con tumores sólidos refractarios”. (NCT01337544).
- b) “LLAT: Infusión de células NK en combinación con quimioterapia en pacientes pediátricos con leucemia/linfoma T refractaria”. (NCT01944982).
- c) “Lydia: Inmunoterapia con células NK activadas y expandidas junto con quimioterapia de rescate en el niño con leucemia aguda en recaída o refractariedad”. (NCT02074657).

4.-Evaluar si existe correlación entre el número de células NKAE y de LT infundidos y la respuesta tumoral.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

Se describen los métodos de producción y activación de células NK disponibles actualmente en nuestro país para uso clínico en humanos: células NK estimuladas *ex vivo* con IL-15 (NK-IL15) y células NK activadas y expandidas utilizando técnicas de cocultivo con la línea celular K562-mbIL15-41BBL (NKAE).

En ambos métodos de producción se obtuvieron a partir de donantes sanos haploidénticos.

1.- SELECCIÓN DE LOS DONANTES.

La selección del donante se basó en: 1) historia clínica y examen físico, 2) despistaje de enfermedades infecciosas, 3) tipaje HLA y 4) tipaje KIR en el que se incluyeron tres niveles: genotipo, fenotipo y tipaje de alelos mediante citometría de flujo, PCR en tiempo real (RT-PCR) y análisis de alelos.

Se realizó tipaje de resolución intermedia a los pacientes y a los donantes para las moléculas HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 (y HLA-DP1) por PCR. Además, se analizaron en los pacientes los ligandos KIR HLA-C (C1 y C2) y HLA-B (Bw4 y Bw6) utilizando PCR de alta resolución con los kits comerciales Thermo Fisher, ELPHA y One Lambda. Por otro lado, se realizó tipaje KIR a los donantes analizando 15 genes humanos KIR y 2 pseudogenes usando un kit de tipaje de Miltenyi Biotec, y se determinó el contenido KIR-B mediante el *score* propuesto por el grupo de la Doctora Cooley^{6,33}.

El tipaje KIR se realizó mediante determinación del genotipo (haplotipo KIR-A o KIR-B), determinación del fenotipo (expresión genética de los receptores KIR en las células NK⁶) y tipaje de alelos (potencia funcional)³⁴. La expresión de receptores KIR se analizó en los donantes mediante citometría de flujo multiparamétrica usando el citómetro Navios (Beckman Coulter) determinando la expresión de KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL1 y KIR3DL1.

El donante haploidéntico se seleccionó según el siguiente orden de preferencia:

- 1) Alorreactividad KIR/HLA definida como ausencia del ligando HLA-I en el paciente, presencia del mismo en el donante y presencia del receptor KIR correspondiente en el donante que reconoce la ausencia de ese ligando HLA-I en el receptor (KIR/HLA *mismatch*).
- 2) En el caso de ausencia de alorreactividad KIR/HLA, se busca el donante con haplotipo KIR-B con mayor *score*.
- 3) Si 1 y 2 fueran no concluyentes, la elección se basa en la citotoxicidad *in vitro* de las células NK frente a la línea celular K562.

2.- PRODUCCIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER ACTIVADAS EX VIVO CON IL-15 (NK-IL15).

Se obtienen a partir de aféresis de sangre periférica no movilizada de donante sano haploidéntico.

Para la selección de células se utiliza la tecnología MACS “*magnetic cell sorting*” (Miltenyi Biotec, Alemania) que permite la separación y selección de células mediante un campo magnético de alto gradiente, a través de un potente imán permanente y una columna de separación con una matriz ferromagnética. Las células que se pretende seleccionar son marcadas con un anticuerpo monoclonal unido a una partícula superparamagnética de 50 nm de hierro-dextrano (óxido de hierro) y quedan retenidas en la columna magnetizada y separadas de las células no marcadas. Posteriormente y tras retirar el campo magnético, las células marcadas retenidas en el imán pueden ser lavadas y recogidas en un compartimento diferente de las células no marcadas. El sistema CliniMACS® utiliza la tecnología MACS permitiendo además su aplicación clínica. Utilizando esta tecnología, se realiza selección en dos pasos de la población linfocitaria NK (CD3-CD56+) a partir del producto de leucoaféresis, como se comenta más adelante.

A continuación, se describe el sistema CliniMACS® utilizado para este procedimiento:

2.1.- Sistema CLINIMACS®. Componentes del CliniMACS System®.

El *CliniMACS CD3 System®* incluye un instrumento controlado por ordenador (*CliniMACS^{plus} Instrument*), un reactivo magnético estéril (*CliniMACS CD3 Reagent*), un set de tubos estériles (*CliniMACS Tubing Set LS* o *CliniMACS Depletion Tubing Set*) y un tampón estéril (*CliniMACS PBS/EDTA Buffer*) y está diseñado para el purgado de células humanas CD3+ de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas.

Los componentes básicos del *CliniMACS^{plus} Instrument* son un ordenador integrado, una unidad de separación magnética, una bomba peristáltica, un sensor de líquido y válvulas de estrangulamiento. El ordenador integrado controla todos los componentes electromecánicos del instrumento y guía el sistema para ejecutar los procesos. La unidad de separación magnética incorpora un imán permanente móvil y el soporte de la columna de selección. Durante la selección, la bomba peristáltica controla la velocidad de flujo a través del *Tubing Set*. El sensor del líquido controla el flujo de suspensión de células marcadas dentro del *CliniMACS Tubing Set*. Un total de once válvulas de estrangulamiento aseguran un flujo controlado durante todo el proceso. Todo el proceso se realiza dentro de un sistema cerrado y estéril.

El CliniMACS CD3 Reagent consiste en un anticuerpo monoclonal murino CD3 conjugado con partículas de hierro-dextrano. Está diseñado para el purgado *in vitro* de células humanas CD3+ de poblaciones celulares hematológicas heterogéneas. Los viales son de un solo uso y no son aptos para su infusión directa. Se debe tener en cuenta que cuando la fracción purgada de células CD3+ es infundida a un paciente, existe la posibilidad de infundir trazas de anticuerpo murino y de hierro-dextrano, por lo que podrían ocurrir reacciones alérgicas o anafilácticas. Por tanto, se debe disponer de medicación y de equipo de cuidados intensivos previo a su infusión. El purgado de células CD3+ debe ser realizado únicamente por personal cualificado y entrenado. El reactivo se debe almacenar a temperatura entre 2 y 8°C. Está fabricado en las máximas condiciones de asepsia.

Con las mismas características, el CliniMACS CD56 Reagent consiste en un anticuerpo monoclonal murino CD56 conjugado con partículas de hierro-dextrano.

El sistema de tamponamiento (CliniMACS PBS/EDTA Buffer) está diseñado exclusivamente como solución de lavado y de procesamiento para la separación *in vitro* de células humanas. No es adecuado para otros procesamientos celulares ni aplicaciones diagnósticas o terapéuticas. Antes de su uso, debe ser suplementado con albúmina sérica humana para obtener una concentración final de 0,5% (se debe añadir cinco gramos de albúmina por cada litro de tampón).

2.2.- Material necesario para el método de selección.

-CliniMACS CD3 Reagent®: Se necesita un vial (7,5 ml) para el purgado de hasta 15×10^9 células CD3+ de un total de células de 40×10^9 .

-CliniMACS CD56 Reagent®: Un vial contiene 7,5 ml, necesario para la selección de hasta 10×10^9 células CD56+ de un total de células de 40×10^9 .

-CliniMACS Tubing Set®: Se utiliza *Tubing Set LS* para el purgado de hasta 20×10^9 células CD3+ de un número total de células que no exceda de 80×10^9 , mientras que el *Depletion Tubing Set* se utiliza para el purgado de 40×10^9 CD3+ de un número total de células que no excedan de 120×10^9 células. Con números altos de células marcadas, se recomienda utilizar *Depletion Tubing Set* para ahorrar tiempo de procesamiento.

-CliniMACS PBS/EDTA Buffer®: Se necesita un total de hasta cinco litros de tampón para cada paso (dos litros para la preparación celular y hasta tres litros para la separación con el CliniMACS®).

2.3.- Método de funcionamiento del sistema CliniMACS®.

Tras la obtención del producto de leucoaféresis, se procesa siempre antes de 24 horas de su recolección. Todo el manejo de los productos se realiza en un ambiente estéril usando técnicas asépticas, en campana de flujo laminar.

En primer lugar, la leucoaféresis se transfiere a una bolsa de transferencia (*Cell Preparation Bag*®) y se determina el número total de leucocitos, el porcentaje y número total de células CD3+ y su viabilidad. Estos datos se introducen en el sistema informático del CliniMACS®.

En segundo lugar se procede a la dilución del producto de leucoaféresis con el tampón hasta un volumen total de 600 ml. Posteriormente se centrifuga el producto para eliminar plaquetas y posterior ajuste de volumen para el marcaje magnético. Previo al marcaje, se añade en la bolsa 3 ml de inmunoglobulina inespecífica IgG (*Flebogamma*® I.V 5%, Grifols) para bloquear las uniones inespecíficas y así aumentar la especificidad de la unión antígeno anticuerpo. Se incuba en agitación durante 5-10 minutos.

Para el marcaje magnético se utiliza el anticuerpo monoclonal murino CD3 conjugado con partículas de hierro-dextrano (*CliniMACS CD3 Reagent*®), inyectando el reactivo (7,5 ml) dentro de la bolsa donde se encuentra el producto de leucoaféresis a través del punto de conexión de inyección. Se mezcla el contenido y se coloca la bolsa de forma plana encima del agitador orbital a aproximadamente 25 revoluciones por minuto (rpm). El tiempo de incubación es de 30 minutos, a una temperatura ambiente controlada entre 19 y 25°C.

Para proceder al purgado de células CD3+ se utiliza el *CliniMACS^{plus} Instrument*®, eligiendo el programa DEPLETION 2.1 como programa de separación. A continuación, se procede a la introducción de algunos parámetros de la muestra necesarios para ajustar la secuencia de separación. Estos datos son: la concentración de leucocitos de la muestra, los porcentajes de las células marcadas y el volumen final de la muestra celular.

A continuación, se procede a instalar la clase de tubos elegidos para realizar la separación celular (*CliniMACS Depletion Tubing Set*®). Una vez instalado el sistema y añadido el sistema tampón, se realiza un prelavado para comprobar que no existen fugas. Tras comprobar que no existen problemas de funcionamiento, se procede a conectar la bolsa, que contiene las células marcadas magnéticamente y lavadas con los tubos de separación.

Tras completar la instalación y la comprobación del funcionamiento, el instrumento realiza el proceso de separación. Las células son cargadas dos

veces en la columna de selección. En las primeras etapas, se purga la masa de células marcadas. En segundo lugar, se purgan las células marcadas que quedan. La bomba transporta el contenido de la bolsa a los tubos. Las células marcadas magnéticamente son retenidas en la columna de selección que está situada en el campo magnético, mientras las células no marcadas pasan a través de la misma y son recogidas. Cuando se alcanza la capacidad de la columna de selección (calculada por el ordenador interno) o cuando la bolsa celular está vacía (lo cual se detecta automáticamente por el sensor de líquido), la carga de las células se detiene. Una vez finalizado el proceso, se desconectan los componentes del sistema y se procede a apagar el ordenador⁷².

Para el enriquecimiento de células CD56+ se realiza el mismo procedimiento, utilizando el reactivo específico (*CliniMACS CD56 Reagent®*) y el programa ENRICHMENT 1.1.

2.4.- Descripción del proceso de selección de la población NK.

Utilizando el sistema CliniMACS®, se realiza selección en dos pasos de la población linfocitaria NK (CD3-CD56+) a partir del producto de leucoaféresis.

- A) Primer paso: purgado de LT: selección de células CD3- mediante CliniMACS CD3 System® del producto de leucoaféresis.
- B) Segundo paso: selección de células NK (CD56+CD3-) obtenida del paso anterior.
- C) Tercer paso: incubación del producto final durante 12-18 horas con IL-15.
- D) Análisis de células previo a su infusión en los pacientes.

A) PRIMER PASO: Purgado de LT CD3+.

Como se ha descrito en el apartado anterior, el CliniMACS CD3 System® emplea anticuerpos CD3 monoclonales selectivos conjugados con partículas superparamagnéticas (*CliniMACS CD3 Reagent®*; Miltenyi Biotec). El anticuerpo CD3 reconoce todas las células T, reaccionando con el 70-80% de los linfocitos de sangre periférica y con el 65-85% de timocitos. Por tanto, las células CD3+ quedan marcadas específicamente mediante la incubación *in vitro* con este reactivo. Utilizando el programa DEPLETION 2.1, el sistema CliniMACS® pasa la suspensión marcada con anticuerpos a través de la columna de separación en la que se generan fuertes gradientes magnéticos. La

columna de separación retiene las células CD3+ marcadas magnéticamente, mientras que las células no marcadas (células diana) fluyen a través de la columna. El sistema realiza varias fases automáticas de lavado recogiendo las células diana CD3- en la bolsa de recolección.

B) SEGUNDO PASO: Selección de células NK (CD56+) de la fracción negativa (CD3-) obtenida del paso anterior.

Utilizando la misma metodología que para el purgado de LT, se procede a la selección de células CD56+ del producto obtenido del paso previo. En este caso se utiliza el anticuerpo monoclonal CD56 (*CliniMACS CD56 Reagent®*; Miltenyi Biotec) conjugado con partículas superparamagnéticas, mediante el programa ENRICHMENT 1.1.

C) Incubación del producto final durante 12-18 horas con IL-15.

El proceso de incubación de las células NK con IL-15 recombinante (CellGenix, Francia) se realiza *ex vivo* en sistema cerrado (*Cell Collection Bag®*), en el interior de una cabina de flujo laminar tipo II (VBH 72 Compact E, Mazzo di Rho; Milán) a una concentración de 10 ng/ml en un incubador a 37°C y 5% de CO₂ durante 12-18 horas. Tras la incubación se realizan tres lavados con cloruro sódico en una centrífuga (KUBOTA 8910 Bunkyo-ku, Tokio, Japón) durante 15 minutos a 200 g sin freno y a temperatura ambiente, 25°C. Finalizados los lavados se infunde al paciente previa premedicación con antitérmico (metamizol) y antihistamínico (difenhidramina). Las condiciones NCF se mantienen durante todo el proceso.

Se define efectividad del proceso como la relación entre la cantidad de células NK recogidas al final del procedimiento respecto a las que serían posibles, es decir, a las que se encuentran en el producto de aféresis, expresado como porcentaje.

En las figuras 4 y 5 se resumen los pasos del protocolo utilizado. En la figura 7 se muestra una imagen del CliniMACS System®.

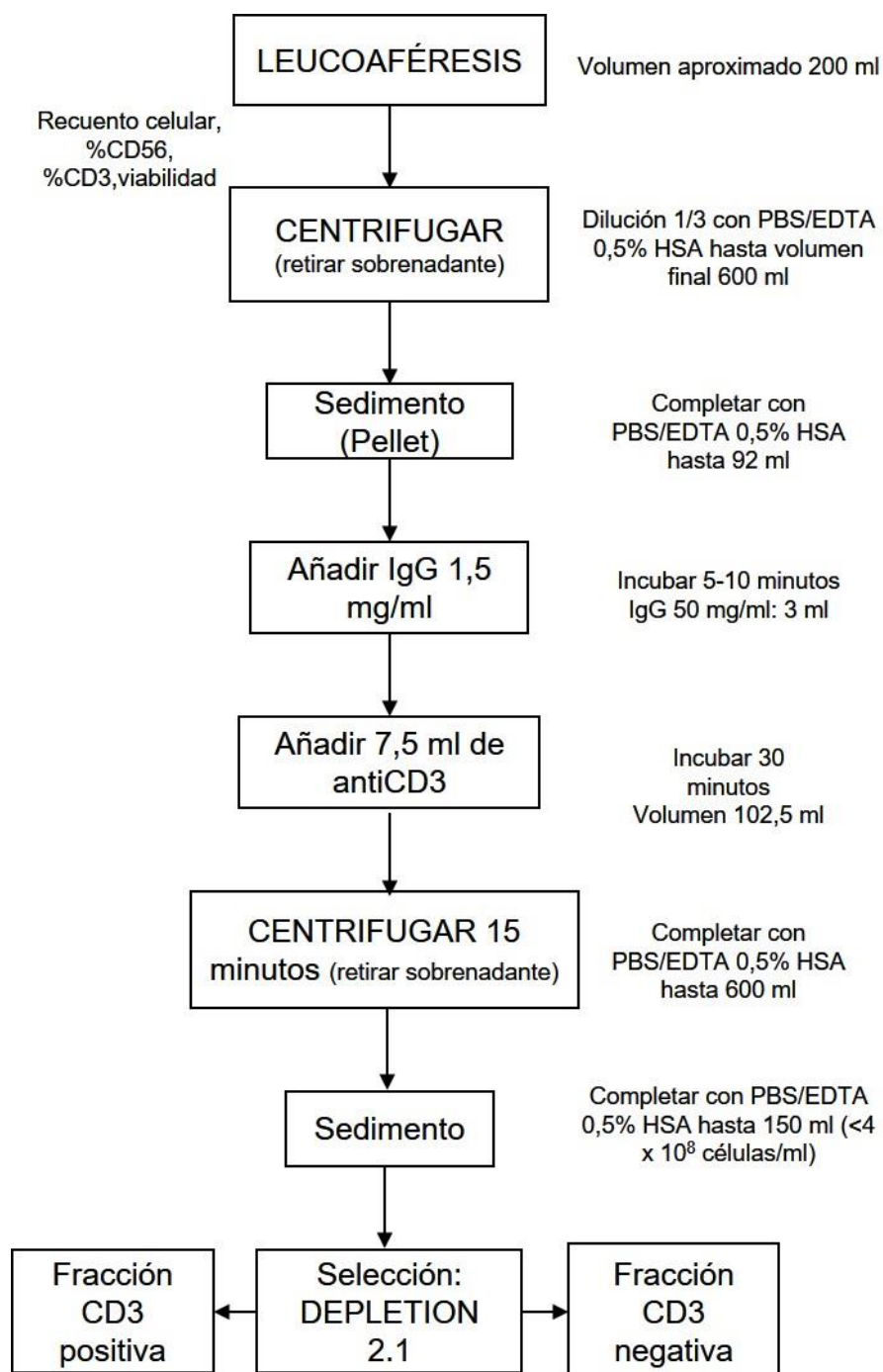


Figura 4: Purgado CD3

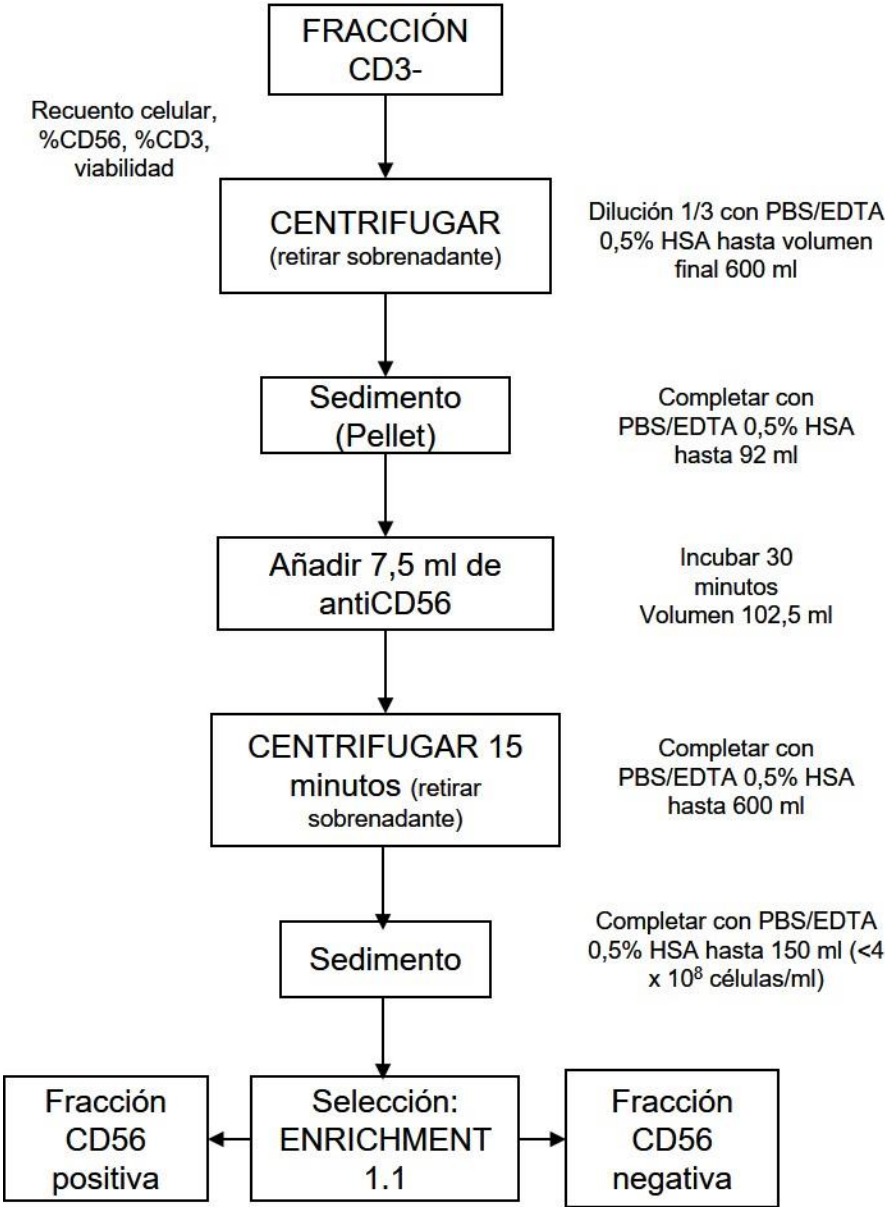


Figura 5: Selección CD56

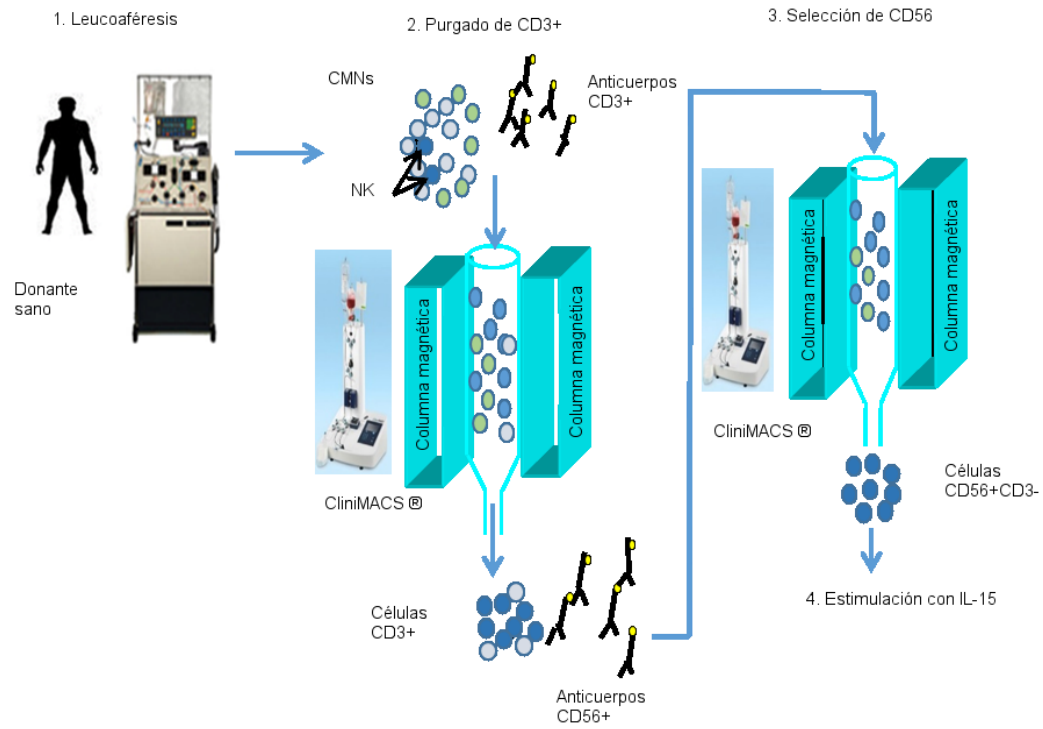


Figura 6: Pasos de la producción de NK-IL15



Figura 7: CliniMACS System®

3.- PRODUCCIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER ACTIVADAS Y EXPANDIDAS (NKAЕ) CON LA LÍNEA CELULAR K562-MBIL15-41BBL.

Las células mononucleares (CMN) se obtuvieron a partir de sangre periférica. Se realizó extracción de 250 ml de sangre a los donantes, utilizando bolsas de recolección convencionales con 15 UI/ml de heparina sódica. La sangre se procesó mediante gradiente de Ficoll (GE Healthcare Bio-Sciences).

El gradiente de Ficoll es un método de separación por gradiente de densidad en el que se utiliza la centrifugación sobre una solución de densidad definida que se denomina Ficoll-Hypaque. Como consecuencia, las partículas con mayor densidad de flotación se desplazan al fondo del tubo. De este modo, las células mononucleares permanecen entre el plasma y la solución, mientras que los eritrocitos y los granulocitos gravitan hacia el fondo.

Para este proceso, la muestra de sangre periférica se diluye a una concentración 1:1 con 50 ml de tampón salino fosfato (PBS, GIBCO) al que se añade 0,5% de EDTA y 0,5% de albúmina sérica humana en seis tubos Falcon. Se añaden 15 ml de Ficoll a cada tubo. Se centrifuga a 400 g durante 30 minutos sin freno. Tras la centrifugación, se recoge el anillo celular y se lava en un tubo Falcon de 50 ml con el tampón.

Posteriormente se realiza un cocultivo celular de las CMNs de sangre periférica obtenidas del donante con la línea celular K562-mbIL15-41BBL, que fue cedida por el Profesor D. Campana (Universidad Nacional de Singapur) mediante un *Material Transfer Agreement* (MTA) e irradiada con 100 Gy. Se utilizó un ratio CMNs/K562-mbIL15-41BBL de 1:1,5 durante dos semanas en el medio RPMI-GlutaMax (Gibco, Life Technologies) suplementado con suero humano AB al 10% (Sigma) y 100 UI/ml de IL-2 (Miltényi). Se añade medio de cultivo cada 48 horas para mantener una concentración de 1×10^6 células/ml. Tras 14-21 días de cocultivo se obtienen células NKAЕ. Finalizado este tiempo se recogen las células, se determina su fenotipo celular y su actividad citotóxica *in vitro* y se procede a la infusión en el paciente⁶⁸.

Se definió ratio de expansión como el aumento del número de células en cultivo entre el día final y el día 0. Se definió fallo de expansión cuando el ratio de expansión de células NK fue igual o inferior a 1, es decir, cuando no se observó expansión celular.

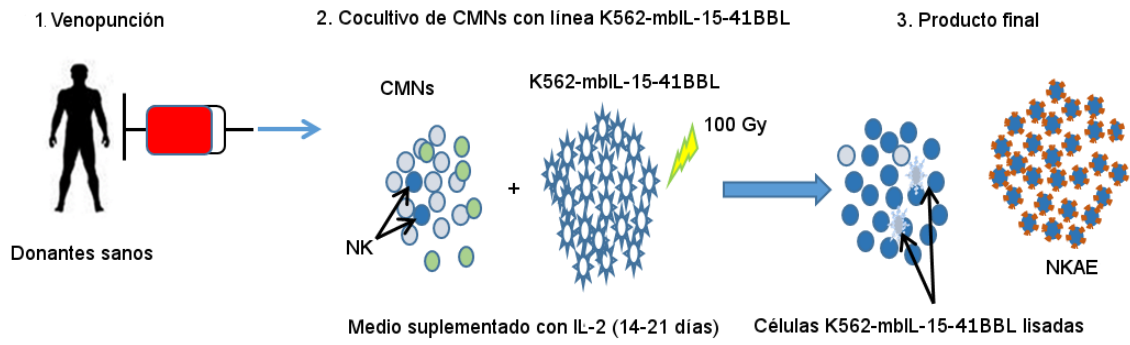


Figura 8: Pasos de la producción de NKAE

4.- ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DEL PRODUCTO FINAL.

Los productos NK-IL15 y NKAЕ fueron analizados durante su producción y previamente a su infusión en los pacientes. Este análisis incluye los siguientes parámetros:

1. Número total de leucocitos
2. Viabilidad y número total de células NK
3. Pureza y recuperación de células NK
4. Viabilidad de LT
5. Características fenotípicas del producto final
6. Capacidad citotóxica del producto final
7. Seguridad del producto (criterios microbiológicos y moleculares)

Con NK-IL15, se estableció como control de calidad que el producto final presentara entre $1-100 \times 10^6$ células totales/kg, con más del 80% de células NK y menos de 1×10^5 LT/kg, con una viabilidad celular mayor del 70% y >50% de actividad citotóxica específica frente a la línea celular K562 a un ratio de 8:1, además de test microbiológicos estériles.

Con NKAЕ el producto final debía presentar una pureza de células NK >80%, con menos de 1×10^6 LT/kg. En aquellos casos en los que el producto final obtenido presentara más de 1×10^6 células/kg con inmunofenotipo CD56-CD3+ se hizo necesaria una eliminación de estos LT mediante técnicas inmunomagnéticas (sistema CliniMACS®) previa a su infusión en pacientes.

4.1.- Características morfológicas.

En ambos métodos de producción, se analizó tras la leucoaféresis, tras cada purgado y selección y semanalmente durante la estimulación las características del producto final, además de previa infusión al paciente (pureza, viabilidad y LT residuales). Las células vivas se contaron usando la cámara de recuento Neubauer (Sigma) tras tinción con solución Trypan blue (Sigma) a una concentración 1:1 para teñir las células no viables.

El análisis de porcentaje y fenotipo de células NK, LT y NKT se realizó semanalmente mediante citometría de flujo multiparamétrica en citómetro FACS CANTO II (BD Biosciences). La expresión de receptores activadores e inhibidores en la superficie de las células NK se evaluó al inicio y 14 días tras su activación y expansión con el método NKAЕ. En NK-IL15, se analizaron en estado basal y en el producto final.

Para determinar el fenotipo de las células NK se utilizaron los siguientes anticuerpos: CD3 PE-Cy7 (Biolegend), CD158b-FITC, CD56-APC, CD16-APC-Cy7 (BD Pharmingen), CD45-FITC, CD19-PE, CD20-PE, CD25-PE, CD336 (NKp44)-PE, 7-AAD (lotest), NKG2D (CD314)-APC, CD69-PE, CD337 (NKp30)-PE, NKG2C (CD159c)-PE, CD57-FITC, CD158ah-FITC, CD158e-FITC, DNAM-1 (CD226)-PE (Miltenyi), NKG2A (CD159a)-PE (R&D systems), NKp46-FITC (AbD Serotec). Para el análisis de los datos se utilizó el software FlowJo vX.0.7.

4.2.- Características funcionales.

Las características funcionales del producto final (capacidad citotóxica de las células NK) se analizaron mediante fluorescencia resuelta en el tiempo con Europium TDA (EuTDA; Perkin Elmer).

Para ello, se realizó cocultivo de las células NK (células efectoras) con la línea celular leucémica K562 (células diana). En el caso de las NK-IL15 se realizó tras obtener el producto final y en el caso de las NKAIE catorce días tras el inicio de la expansión.

Este procedimiento consiste en marcar las células diana con un ligando fluorescente en forma de éster (BATDA). Este ligando penetra rápidamente la membrana celular y dentro de la célula es hidrolizado por las enzimas acetilesterasas a una forma hidrofílica (TDA) que no puede traspasar la membrana. Cuando las células efectoras se ponen en contacto con las células diana, éstas se lisan liberando TDA. El TDA se mezcla con la solución Europium dando una sustancia altamente fluorescente. La medida de esta fluorescencia se correlaciona con la cantidad de células lisadas.

Se establecen cuatro ratios Efector/Diana, 8:1, 4:1, 2:1 y 1:1.

Al calcular los resultados, se tiene en cuenta el porcentaje de lisis espontánea existente, además del porcentaje de lisis producido por las células efectoras. Para ello, se emplearon las siguientes fórmulas para calcular la citotoxicidad específica y espontánea:

$$\%_{\text{lisis específica}} = \frac{\text{lisis experimental} - \text{lisis espontánea}}{\text{máxima lisis} - \text{lisis espontánea}} \cdot 100$$

$$\%_{\text{lisis espontánea}} = \frac{\text{lisis espontánea} - \text{señal de fondo}}{\text{máxima lisis} - \text{señal de fondo}} \cdot 100$$

4.3.- Análisis microbiológicos.

Se comprobó la esterilidad de los productos para cumplir las normas de calidad de la Farmacopea Europea 2.6.1. La ausencia de Mycoplasma se analizó mediante un kit de PCR convencional para detección de Mycoplasma (VenorGeM, Sigma Aldrich). La tinción de Gram se realizó usando Color Gram 2 test bioMérieux.

4.4.- Análisis moleculares.

El análisis molecular de seguridad se realizó por hibridación genómica comparativa (CGH) y RT-PCR. Para ello, se aisló el ADN y ARN de los cultivos celulares usando el microkit AllPrep ADN/ARN (Qiagen). Se utilizaron como genes control ADN humano masculino purificado (Promega Biotech). Para la CGH se utilizó la plataforma CGH-SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) de Agilent.

En las NK-IL15, se analizó en el producto final la expresión de c-Myc y de telomerasa transcriptasa inversa (TERT) por RT-PCR para verificar la ausencia de potencial oncogénico. Para ello se utilizaron sondas y “*primers*” TaqMan (Applied Biosystems, Life Technologies). Además se descartó la presencia de aberraciones cromosómicas en el ADN mediante CGH.

En las NKA-E, se realizó el análisis molecular en los días 14 y 21 del cultivo, analizando la expresión de c-Myc y de TERT mediante RT-PCR. Para ello se utilizaron sondas y “*primers*” TaqMan (Applied Biosystems, Life Technologies). Asimismo, se analizó la ausencia de células K562-mb15-41BBL verificando la ausencia de BCR-ABL mediante el mismo método utilizando sondas de Tip Molbiol (Eresburgstrasse). También se descartaron aberraciones cromosómicas en el ADN por hibridación CGH a base de *microarrays*.

5.- UTILIZACIÓN DE NK-IL15 Y NKAЕ EN ENSAYOS CLÍNICOS.

Los productos NK-IL15 y NKAЕ se utilizaron en tres ensayos clínicos. Todos ellos se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki y la legislación española vigente sobre ensayos. Los protocolos y documentos de consentimiento fueron revisados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Niño Jesús y del Hospital La Paz (H-1004-027-315). Se obtuvo el consentimiento informado de los padres o representantes legales del menor así como de los donantes previo a la aféresis. Además, los menores a partir de 12 años, prestaron su asentimiento.

5.1.-Trasplante haploidéntico e infusión de células NK estimuladas con IL-15 en pacientes con tumores sólidos refractarios. Código EudraCT 2009-01 0186-23. (NCT01337544).

Ensayo clínico fase I/II dirigido a pacientes con tumores sólidos refractarios. Participaron en el mismo un total de seis pacientes, todos ellos en situación de refractariedad terapéutica.

Los criterios de inclusión fueron:

- Niños con tumores sólidos con comprobante histológico (linfomas, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcomas de partes blandas) refractarios o recurrentes a tratamiento convencional.
- Presencia de enfermedad mensurable por técnicas de imagen, o por técnicas moleculares o celulares.
- Edad: hasta los 21 años.
- Tratamientos previos: debían haber recibido dos líneas de tratamiento estándar y no haber presentado respuesta favorable.
- Esperanza de vida superior a 3 meses.
- Índice de Lansky > 60%.
- Alteración funcional de órganos (hepática, renal, respiratorio) leve (<2), según los criterios del *National Cancer Institute* (NCI CTCAE v3).
- Fracción de eyección del ventrículo izquierdo >50%.
- Otorgar consentimiento informado de acuerdo con la normativa legal vigente.

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con proceso infeccioso activo u otro estado médico subyacente grave.
- Pacientes con antecedentes de mal cumplimiento terapéutico.

- Pacientes que tras una evaluación psico-social se censuran como no aptos para el procedimiento.
- Serología VIH positiva.

La infusión de células NK-IL15 se realizó el día +30 de un TPH de sangre periférica de donante haploidéntico con purgado CD3/CD19, previa movilización con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (G-CSF).

Un mes tras el trasplante se realizó una leucoaféresis no movilizada al mismo donante haploidéntico y se seleccionó la población CD56+CD3- según la metodología CliniMACS®. Tras incubación con IL-15 y tras varios lavados se infunde al paciente en un tiempo estimado en función del volumen obtenido y el peso del paciente.

Durante el tratamiento se administró profilaxis antiemética (ondansetrón 4 mg/m²/8 horas), anticomicial (clonazepam 0,01 mg/kg/8 horas), antimicrobiana (trimetoprim/sulfametoxazol 2,5 mg/kg/12 horas, fluconazol 5 mg/kg/día, aciclovir 500 mg/m²/8 horas) y de enfermedad veno-oclusiva (ácido ursodeoxicólico 5 mg/kg/12 horas).

El esquema terapéutico se representa en la figura 9:

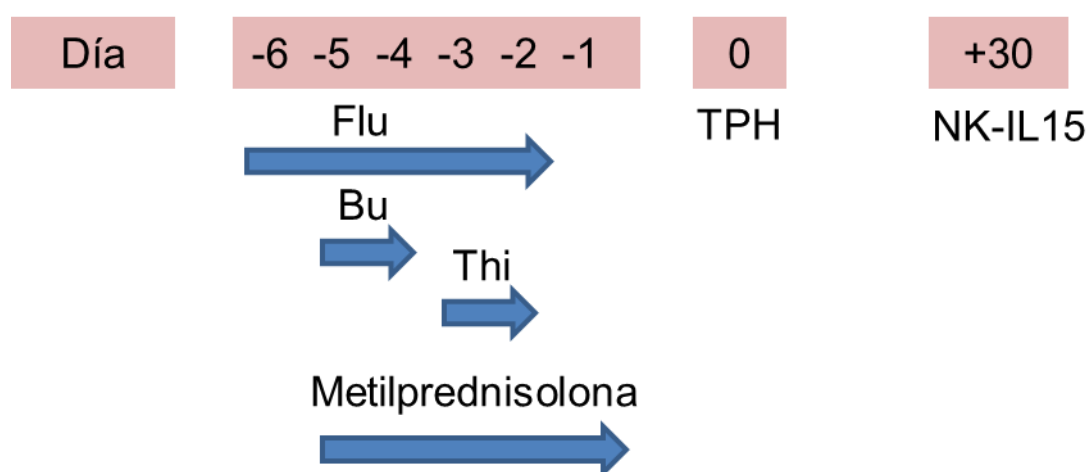


Figura 9: Protocolo de tratamiento del ensayo NK-IL15

Posteriormente se realizó seguimiento clínico-analítico a los pacientes y estudio de respuesta tumoral a la terapia recibida mediante técnicas de imagen y/o moleculares.

5.2.-Infusión de células Natural Killer en combinación con quimioterapia en pacientes pediátricos con leucemia/linfoma T refractaria. Estudio LLAT. Código EudraCT: 2012-000054-63. (NCT01944982).

Ensayo fase I-II para pacientes pediátricos con leucemia/linfoma T refractario. Se propone un tratamiento de rescate con quimioterapia y terapia celular con células NKAЕ. El régimen de quimioterapia consistió en la asociación de etopósido (100 mg/m², cinco días), nelarabina (650 mg/m², cinco días), ciclofosfamida (440 mg/m², cinco días) y triple terapia intratecal (régimen modificado del grupo descrito previamente por el grupo de Commander⁷³). El régimen de inmunoterapia consiste en la utilización de NKAЕ de un donante haploidéntico.

Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes entre 0 y 21 años diagnosticados de leucemia aguda linfoblástica de estirpe T o linfoma linfoblástico T en cualquier recaída o en situación de refractariedad terapéutica. Los criterios citomorfológicos de leucemia aguda linfoblástica T son los descritos por el grupo de tratamiento PETHEMA que incluye (CD3 citoplasmático (cCD3), CD3 de superficie (sCD3), CD7, CD2, CD5, CD1a y CD4/CD8). Los criterios inmunohistoquímicos del linfoma linfoblástico T son los descritos por la clasificación de la OMS (Tdt+, CD4+/-,CD8+/-,CD7+, CD1-).
- Índice de Lansky > 60%.
- Fracción de eyección del ventrículo izquierdo >39%.
- Otorgar consentimiento informado.

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con antecedentes de mal cumplimiento terapéutico.
- Pacientes que tras una evaluación psico-social se censuran como no aptos para el procedimiento.
- Alteración funcional de órganos (hepática, renal, respiratorio) grave (4), según los criterios del *National Cancer Institute* (NCICTCAE v3).
- Serología VIH positiva.

Se programaron dos ciclos de tratamiento, con una duración aproximada de cuatro semanas cada uno. En el primer ciclo, los pacientes recibieron en el día 0 una infusión de una dosis máxima de 5×10^7 células NKAЕ/kg y en el día 0 del segundo ciclo una nueva infusión de un máximo de 1×10^8 células NKAЕ/Kg. Desde el día 0 se administraron 6 dosis de IL-2 subcutánea en días alternos (1×10^6 UI/m²) para activar y expandir las NKAЕ circulantes. Durante el

tratamiento se administró profilaxis antiemética (ondansetrón 4 mg/m²/8 horas) y antimicrobiana (trimetoprim/sulfametoxazol 2,5 mg/kg/12 horas dos veces a la semana, anfotericina B liposomal 3 mg/kg/día y antibioterapia según protocolo).

La infusión de NKAЕ se realizó en el día +21 del cultivo celular.

El esquema terapéutico se muestra en la figura 10:

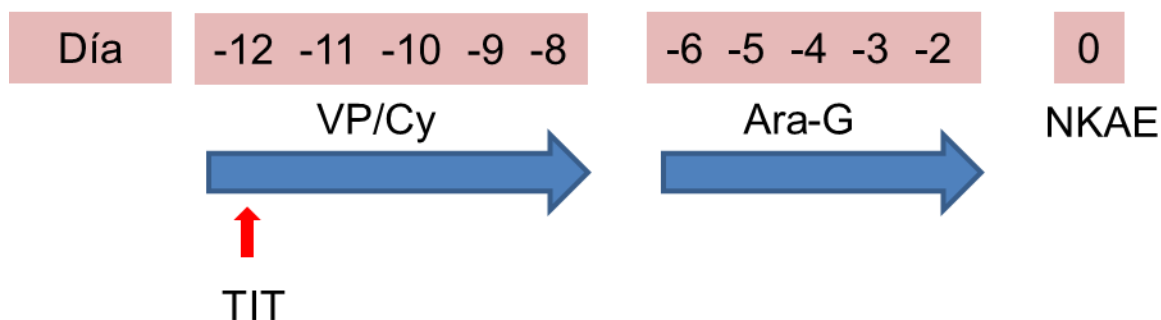


Figura 10: Protocolo de tratamiento del ensayo LLAT

En el seguimiento cada paciente se monitorizó para la detección de posibles efectos adversos, se realizó recuento de LT, NK y NKT, además de evaluación de la actividad citotóxica *ex vivo* de las células NK del paciente medida con fluorescencia a tiempo real Eu-TDA y tasa de respuesta objetiva según los criterios citomorfológicos y enfermedad mínima residual (EMR) (citometría y/o PCR tiempo real) al final del tratamiento.

5.3.-LANK-2: Inmunoterapia con células NKAЕ junto con quimioterapia de rescate en el niño con leucemia aguda en recaída o refractariedad. Estudio Lydia. Código EudraCT 2012-005146-38. (NCT02074657).

Ensayo clínico fase I/II cuyo objetivo principal fue determinar la seguridad y eficacia de la infusión de células NKAЕ de un donante haploidéntico junto con quimioterapia de rescate en pacientes pediátricos, adolescentes y adultos jóvenes con leucemia aguda de cualquier tipo, refractaria al tratamiento o en recaída.

El seguimiento de los pacientes se realizó hasta que presentaron un evento definitivo (recaída, progresión o fallecimiento), o bien salieron del estudio para recibir otro tratamiento (remisión, tratamiento de consolidación con TPH).

Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes de edad comprendida entre 0 y 23 años diagnosticados de leucemia aguda linfoblástica o mieloblástica en situación clínica de segunda recaída, de recaída postrasplante o en situación de refractariedad.
- Índice de Lansky > 60%.
- Alteración funcional de órganos (hepática, renal, respiratorio) leve (<2), según los criterios del *National Cancer Institute* (NCI CTCAE v4).
- Fracción de eyección del ventrículo izquierdo >39%.
- Otorgar consentimiento informado.
- Presencia de un donante haploidéntico compatible (padre/madre/hermano).

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con antecedentes de mal cumplimiento terapéutico.
- Pacientes que tras una evaluación psico-social se censuran como no aptos para el procedimiento.
- Alteración funcional de órganos (hepática, renal, respiratorio) grave (4), según los criterios del *National Cancer Institute* (NCI CTCAE 4.3).
- Serología VIH positiva.

Se programaron dos ciclos de quimioterapia de rescate, separados al menos tres semanas y no más de ocho, idealmente cuatro semanas. La quimioterapia de rescate fue indicado por el equipo médico en función de la historia previa de fármacos recibidos, así como de las toxicidades y el estado clínico del paciente. En todos los casos fue inmunoablativa. Se utilizaron tres regímenes: clofarabina, etopósido y ciclofosfamida (CLOVE); FLAG-Ida (fludarabina, idarrubicina, citarabina y G-CSF) y Flu/Cy (fludarabina y ciclofosfamida).

La infusión de células NKA-E se realizó al menos 24 horas después de finalizada la quimioterapia. Se programaron dos infusiones por ciclo separadas una semana (días +14 y +21 del cultivo), de manera que durante las tres semanas de cultivo, a partir de la semana 1 se recogieron las células para la infusión, y se mantuvo el remanente en cultivo para la segunda infusión. En el primer ciclo se infundieron dos dosis de hasta $2,5 \times 10^7$ células NKA-E/kg, en los días 0 y 7 (días +14 y +21 del cultivo celular), y en el segundo ciclo dos dosis de hasta 5×10^7 células NKA-E/kg, en los mismos días. En ningún caso se infundió más de 1×10^5 LT/kg. Posteriormente, se administró IL-2 (1×10^6 UI/m² subcutánea, en días alternos, durante 2 semanas) para favorecer la expansión *in vivo* de las células NK. Durante el tratamiento se administró profilaxis

antiemética (ondansetrón 4 mg/m²/8 horas) y antimicrobiana (trimetoprim/sulfametoxazol 2,5 mg/kg/dosis cada 12 horas dos días a la semana, anfotericina B liposomal 3 mg/kg/24 horas y antibioterapia según protocolo).

El protocolo terapéutico se muestra en la figura 11:

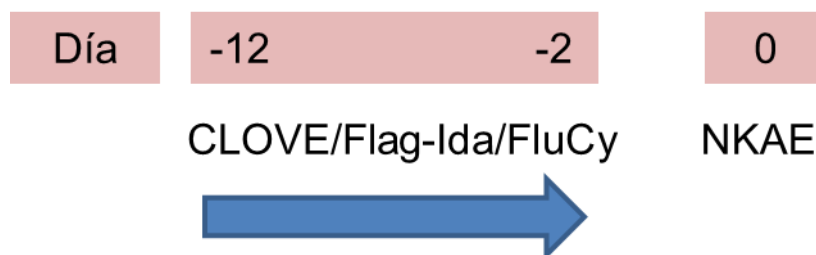


Figura 11: Protocolo de tratamiento del ensayo Lydia

En el seguimiento posterior de los pacientes se monitorizan los posibles efectos adversos, se realiza recuento de linfocitos T, NK y NKT, además de evaluación de la actividad citotóxica, tasa de respuesta objetiva según los criterios citomorfológicos y EMR (citometría y/o PCR tiempo real) al final del tratamiento.

6.- EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD.

Para evaluar la toxicidad del tratamiento en el ensayo con NK-IL15, se realizó una recogida de efectos adversos en los pacientes en el día +30 del TPH (previo a la infusión) y tras la infusión del producto NK-IL15 en los días +60 y +90.

En los estudios LLAT y Lydia, se realizó una recogida de efectos adversos en los pacientes tras cada ciclo y tras cada infusión.

La toxicidad se clasificó según la versión 4.0 del sistema de Criterios de Toxicidad Comunes o Criterios Terminológicos Comunes para Eventos Adversos (CTCAE) del *National Cancer Institute*.

7.- EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA.

En el ensayo de NK-IL15, la respuesta al tratamiento se evaluó mediante Tomografía Axial Computarizada (TAC) en el día +30 (previo a la infusión) y en el día +90 tras el TPH de acuerdo a los Criterios de Evaluación de Respuesta de los Tumores Sólidos (RECIST).

En LLAT y Lydia, para evaluar la respuesta al tratamiento se realizó estudio de médula ósea mediante citología y citometría de flujo. Dicha evaluación se

realizó previa al tratamiento y tras cada ciclo una vez conseguida la recuperación hematológica o bien 6 semanas tras el ciclo si no se observaba recuperación.

Se definió remisión completa como presencia de <5% de blastos en médula ósea mediante citología. Se definió EMR positiva como > 0,1% blastos por citometría de flujo.

Los linfomas se evaluaron mediante PET-TAC tras dos ciclos de tratamiento. Se definió remisión completa como desaparición de la clínica y los hallazgos radiológicos; remisión parcial como disminución del diámetro de la lesión > 25% y ausencia de respuesta como disminución del diámetro de la lesión < 25%.

8.- ESTUDIO DEL QUIMERISMO.

Los porcentajes del quimerismo del donante en las diferentes subpoblaciones celulares se midieron usando PCR semicuantitativa basada en el análisis de regiones microsatélites polimórficas (STR), con un límite cuantificable del 1-3%. Para ello se emplearon 8 regiones STR: D21S11, TPOX, D18S51, Penta E, VWA, D22S689, D7S820, Penta D.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica heparinizada de donantes y receptores previo al TPH y de receptores tras el TPH. El ADN se aisló con el kit QIAmp (QIAGEN). Los productos amplificados se analizaron en el Analizador Genético ABI Prisma 3130 (Applied Biosystems) con el programa informático GeneScan (versión para Windows). La proporción final de quimerismo del donante se obtuvo con la media de los resultados de los alelos individuales de las STR^{74,75}.

9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis de los datos se llevó a cabo en el Departamento de Estadística del Hospital Universitario La Paz. Las variables cuantitativas se expresan como la media aritmética y su desviación estándar (DS) cuando la distribución es normal. En los casos donde la distribución de la variable es asimétrica, se expresan como mediana \pm rango intercuartílico (IQR) para evitar una mayor influencia de los valores extremos.

Para la comparación de los datos de producción y citotoxicidad se utilizaron test no paramétricos de Wilcoxon para variables dependientes. Para variables que no siguiesen una distribución normal, se aplicaron pruebas no paramétricas como la U de Mann Whitney. Para la comparación de los datos de toxicidad se utilizó el test exacto de Fisher y para la comparación de la

respuesta medular el test de Friedman. Se definió significación estadística como $p \leq 0,05$.

La supervivencia se calculó desde la fecha de inclusión en el ensayo hasta la fecha de fallecimiento. Las curvas de supervivencia se realizaron por el método de Kaplan–Meier. Se comparó la supervivencia entre los ensayos con NKAЕ mediante log rank test.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (versión 11.0, Cary, NC).

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- PRODUCCIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER ACTIVADAS *EX VIVO* CON IL-15 (NK-IL15).

Se recogen en este apartado los datos correspondientes a la producción de NK-IL15 en el ensayo clínico "Trasplante haploidéntico e infusión de células NK estimuladas con IL-15 en pacientes con tumores sólidos refractarios".

En dicho ensayo, se realizaron un total de 8 infusiones de NK-IL15 en 6 pacientes. Los dos primeros pacientes recibieron dos infusiones cada uno y los cuatro restantes, una infusión cada uno.

En la tabla 5 se muestran los datos obtenidos en los 8 procedimientos. Se recoge la cantidad de células totales, LT y células NK posteriormente a la aféresis, tras el purgado de LT y tras la selección de células CD56+CD3-, y por último, tras la estimulación con IL-15. Asimismo se muestran los datos de viabilidad celular en cada paso del procedimiento. Las células se expresan en número de células x 10⁶/μL.

- En los productos de aféresis, la media de células totales fue 22291,75 ± 17311,64 x 10⁶ (rango 7700-57800 x 10⁶) con un 8,25% ± 4,48% de células NK y un 56,2% ± 4,42% de LT. La viabilidad fue de un 98,1% ± 1,9%.
- Tras el purgado de LT, la media de células totales fue de 6582,5 ± 3664,91 x 10⁶ (rango 2700-14000 x 10⁶) con un 27,57% ± 13,1% de células NK y un 0,2% ± 0,27% de LT. La viabilidad fue de 99,75% ± 0,25%.
- Tras la selección de células CD56+CD3- la media de células totales fue de 1148,75 ± 1159,35 x 10⁶ (rango 270-3700 x 10⁶) con un 93,64% ± 8,33% de células NK y un 0,025% ± 0,07% de LT. La viabilidad fue de 99,36% ± 0,78%.
- Tras la estimulación con IL-15, la media de células totales fue de 529,75 ± 563,79 x 10⁶ (rango 460-1600 x 10⁶) con un 95,4% ± 3,5% de células NK sin detectarse LT (0 ± 0). La viabilidad de los productos finales fue de 92,65% ± 14,65%.

Tabla 5: Número de células totales, LT y células NK en cada procedimiento

N=8		Aféresis	Purgado CD3+	Selección CD56+	Estimulación IL-15
1	C. totales	13500	5290	730	495
	NK	9% (1200)	31,37% (1640)	98,63% (710)	100% (495)
	LT	49,6% (6600)	0,73% (380)	0	0
	Viabilidad	99,4%	99,9%	99,5%	100%
2	C. totales	21700	7210	550	210
	NK	9,5% (1900)	46,5% (3310)	98,77% (530)	97,7% (203)
	LT	56,7% (20100)	0,02% (14)	0	0
	Viabilidad	93,8%	99,8%	99,8%	99,8%
3	C. totales	13600	3900	490	130
	NK	2,6% (200)	18,7% (700)	76,1% (370)	93% (120)
	LT	61,4% (8200)	0,03% (10)	0	0
	Viabilidad	98%	99,6%	99,8%	98,5%
4	C. totales	7700	2700	270	46
	NK	4,4% (300)	12,2% (300)	86,1% (230)	90% (41)
	LT	53,2% (4000)	0	0	0
	Viabilidad	98,4%	100%	100%	57,3%
5	C. totales	57800	9500	200	1600
	NK	7,2% (4000)	33,5% (3100)	98,3% (196)	97% (1550)
	LT	61,2% (35200)	0	0	0
	Viabilidad	98,4%	99,4%	99,6%	99,6%
6	C. totales	39000	14000	3700	1200
	NK	17,7% (6600)	43,6% (6000)	99,2% (3660)	97,8% (1160)
	LT	58,8% (22600)	0,2% (20)	0	0
	Viabilidad	99,7%	99,4%	98,9%	95,9%
7	C. totales	11800	4370	530	220
	NK	7,1% (800)	14,9% (600)	94,2% (490)	96,2% (210)
	LT	57,4% (6700)	0,5% (20)	0,2% (1)	0
	Viabilidad	97,5%	99,9%	99,7%	99,7%
8	C. totales	13200	5600	920	330
	NK	8,5% (1000)	19,8% (1000)	97,8% (890)	91,5% (300)
	LT	51,3% (6700)	0,1% (50)	0	0
	Viabilidad	99,6%	100%	97,6%	90,4%

Estos datos se representan gráficamente en las figuras 12, 13 y 14.

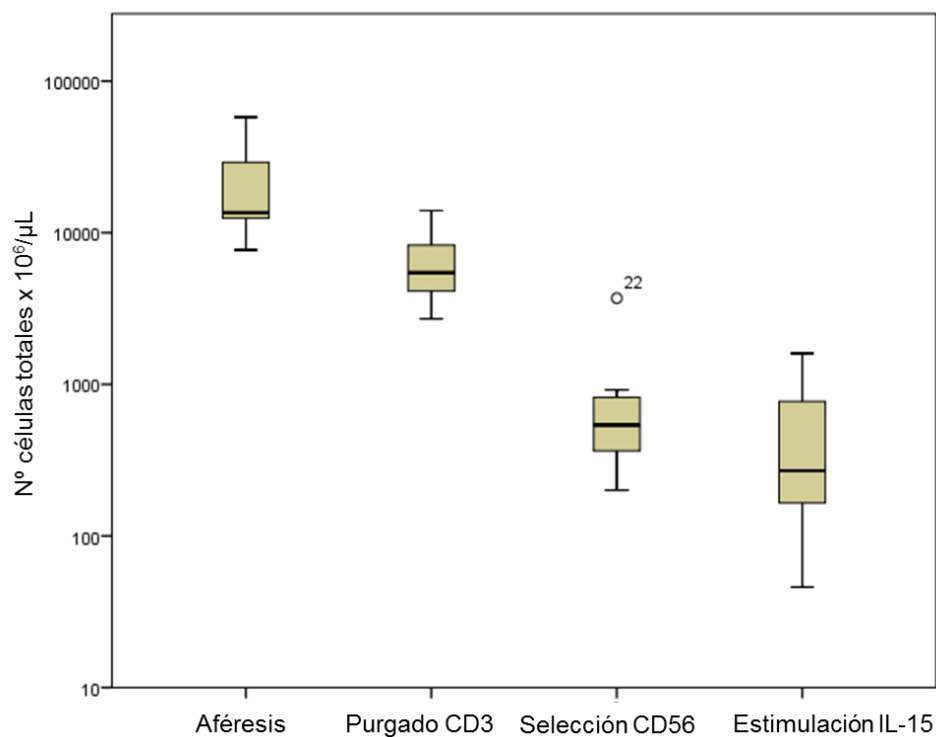


Figura 12: Células totales en cada paso del proceso de producción

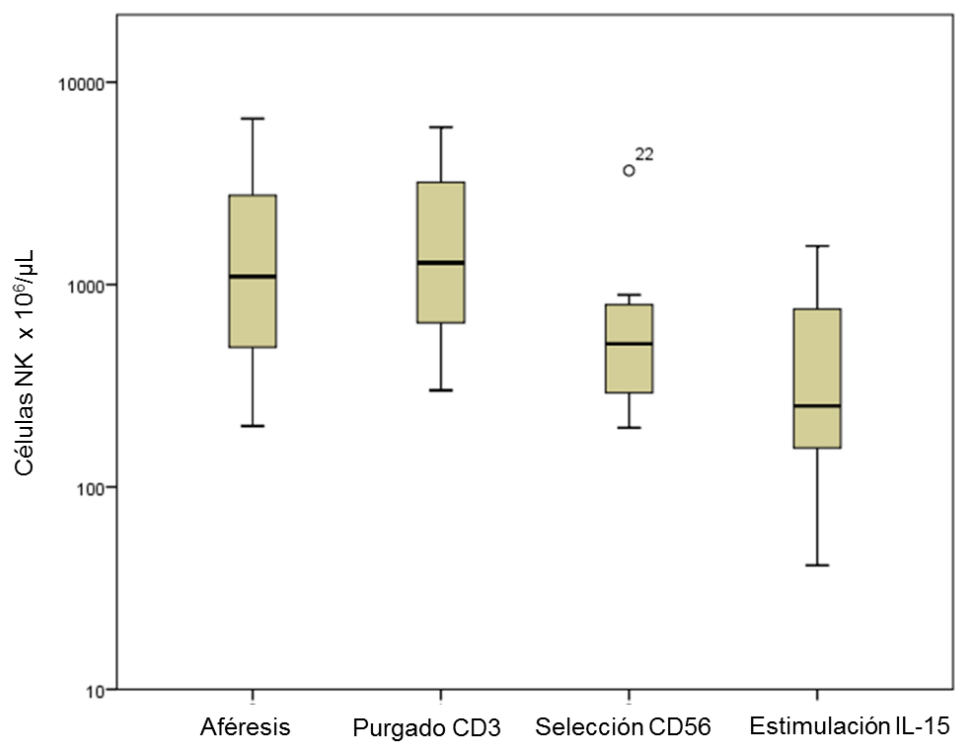


Figura 13: Células NK en cada paso del proceso de producción

Resultados

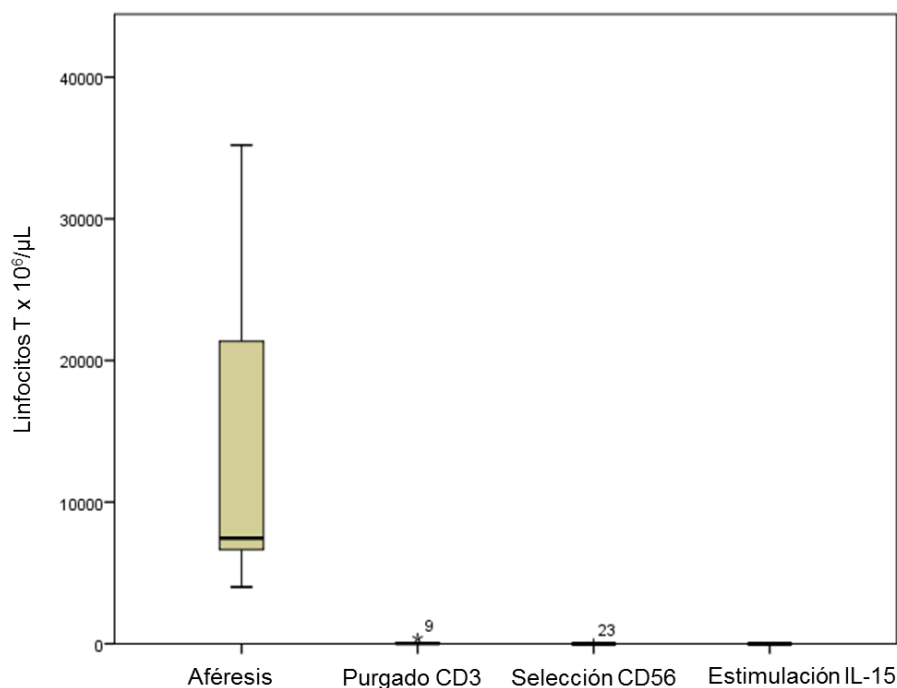


Figura 14: LT en cada paso del proceso de producción

Con estos datos, se puede representar de forma gráfica (figura 15) la evolución de la cinética de las poblaciones linfocitarias NK y LT respecto al número de células totales/μL en cada paso del procedimiento. Se observa como la población de células NK experimenta un notable aumento con la selección de CD56+ mientras que los LT tras el purgado CD3+, son prácticamente indetectables.

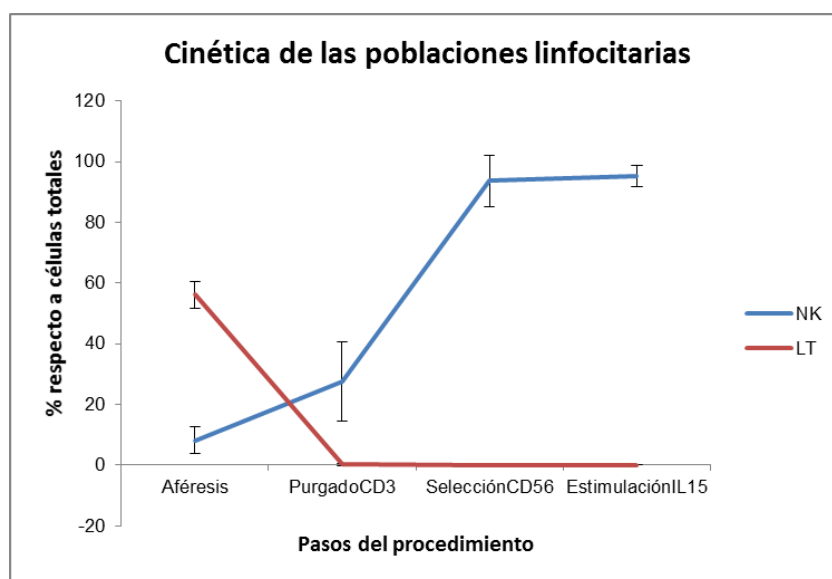


Figura 15: Cinética de las poblaciones linfocitarias

1.1.- Efectividad del proceso.

En la tabla 6 se recoge la efectividad en cada uno de los 8 procedimientos del ensayo, las medias y desviación estándar de las mismas. La efectividad media del proceso fue de $25,51\% \pm 11,6\%$.

Tabla 6: Efectividad

Producto celular	Efectividad (%)
1	40,74
2	9,95
3	34,19
4	12,16
5	37,29
6	17,00
7	25,26
8	27,48
MEDIA	25,51
DS	11,60

En la tabla 7 se recogen la cantidad media de células NK y de LT en cada paso del procedimiento, con su desviación estándar.

Tabla 7: Media \pm DS de células NK y de LT en cada paso

Media \pm DS	Aféresis	Purgado CD3	Selección CD56	Estimulación IL-15
NK ($\times 10^6$)	2124,35 \pm 2292,69	2142,91 \pm 1966,87	1113 \pm 1164,49	513,51 \pm 550,3
LT ($\times 10^6$)	12914,41 \pm 10806,9	12,1 \pm 15,21	0,13 \pm 0,37	0

- Células totales perdidas y recuperadas en cada paso del proceso:

En el proceso de purgado de LT, se pierden una media de 11,56% de células totales y se recuperan el 88,44%.

En la selección de células NK se pierden una media de 39,48% y se recuperan 60,51%.

Tras el proceso de estimulación con IL-15, la media de células perdidas es 57,48%, recuperándose el 42,51% de las células.

1.2.- Análisis microbiológico.

En todos los procedimientos se comprobaron condiciones de esterilidad, tinción de Gram y ausencia de Mycoplasma previo a la infusión, siendo el resultado negativo en todos ellos.

1.3.- Análisis molecular de seguridad.

Se verificó en el producto final la ausencia de potencial oncogénico demostrando la ausencia de expresión de c-Myc y de TERT.

Tampoco se detectaron aberraciones cromosómicas en el ADN por *microarrays CGH*.

1.4.- Características fenotípicas del producto NK-IL15 por citometría de flujo.

En la figura 16 se muestran datos representativos de las características fenotípicas analizadas por citometría de flujo en los distintos pasos del procedimiento.

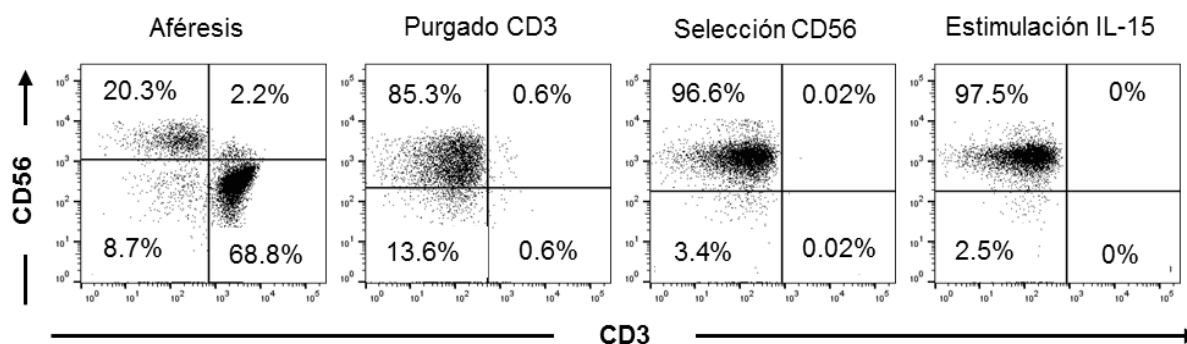


Figura 16: Características morfológicas del producto NK-IL15 por citometría de flujo

2.- PRODUCCIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER ACTIVADAS Y EXPANDIDAS (NKAE) CON LA LÍNEA CELULAR K562-MBIL15-41BBL.

Se recogen en este apartado los datos correspondientes a la producción de células NKAE.

Se realizaron un total de 32 expansiones, 10 en el ensayo LLAT en 7 pacientes y 22 en el proyecto Lydia en 13 pacientes.

En las figuras 17, 18, 19 y 20 se representan los resultados de producción de células totales, células NK, LT y células NKT en los días 0, +7, +14 y +21 del cultivo celular de las 32 expansiones. Se debe señalar que en el día +21 sólo se recogen los resultados de las expansiones realizadas en LLAT, ya que en Lydia, al haber manipulación entre los días +14 y +21 de cultivo por la infusión, este resultado no es valorable.

2.1.- Células totales.

La media de células totales en el día 0 fue de $131,22 \pm 63,71 \times 10^6$ aumentando hasta $639,78 \pm 435,81 \times 10^6$ en el día +14 y hasta $1127,3 \pm 960,18 \times 10^6$ en el día +21.

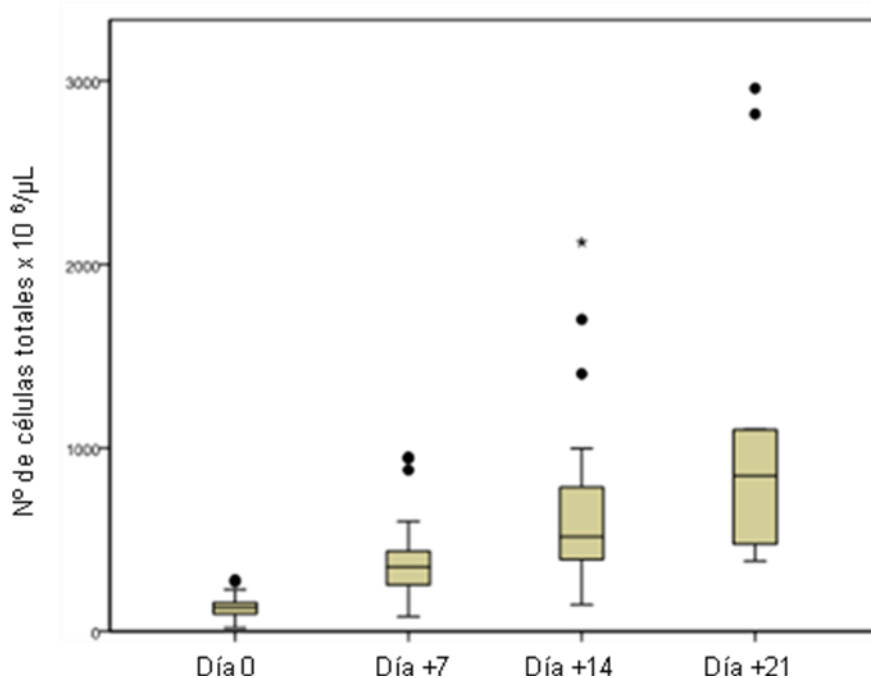


Figura 17: Evolución del número de células totales en cultivo

2.2.- Células NK.

La media de células NK en el día 0 fue de $12,74 \pm 8,78 \times 10^6$ ($9,14\% \pm 3,56\%$) aumentando hasta $515,23 \pm 345,03 \times 10^6$ ($79,93\% \pm 17,43\%$) en el día +14 y hasta $837,52 \pm 560,27 \times 10^6$ ($82,19\% \pm 11,83\%$) en el día +21.

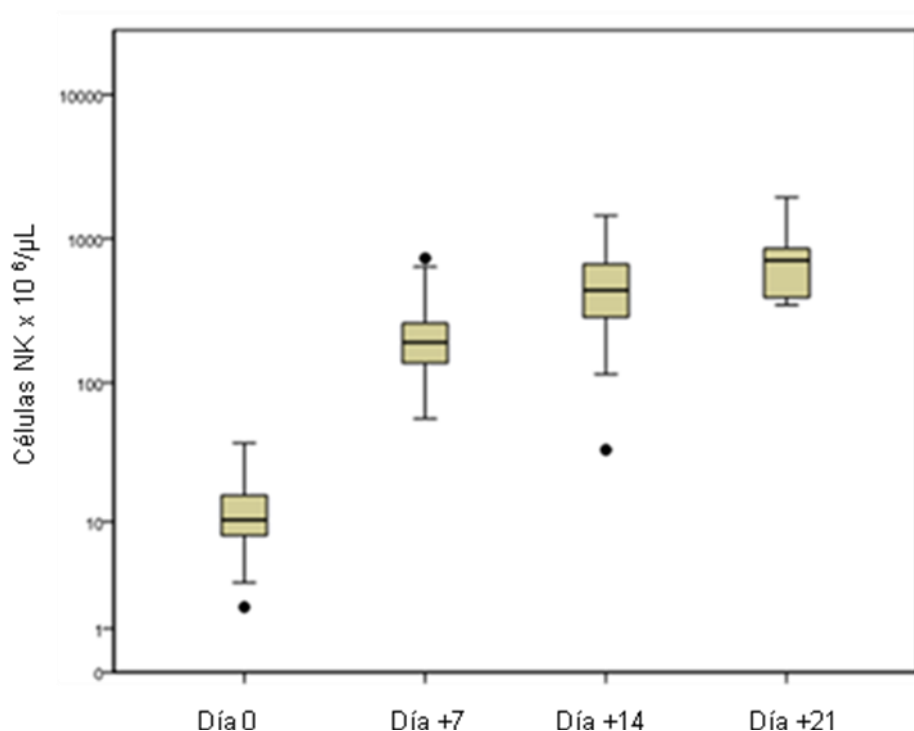


Figura 18: Evolución de las células NK en cultivo

2.3.- Linfocitos T.

La media de linfocitos T en el día 0 fue de $72,48 \pm 35,19 \times 10^6$ ($55,85\% \pm 17,57\%$) descendiendo hasta $52,66 \pm 42,88 \times 10^6$ ($9,71\% \pm 8,28\%$) en el día +14 y a $73,15 \pm 60,4 \times 10^6$ ($6,01\% \pm 3,38\%$) en el día +21.

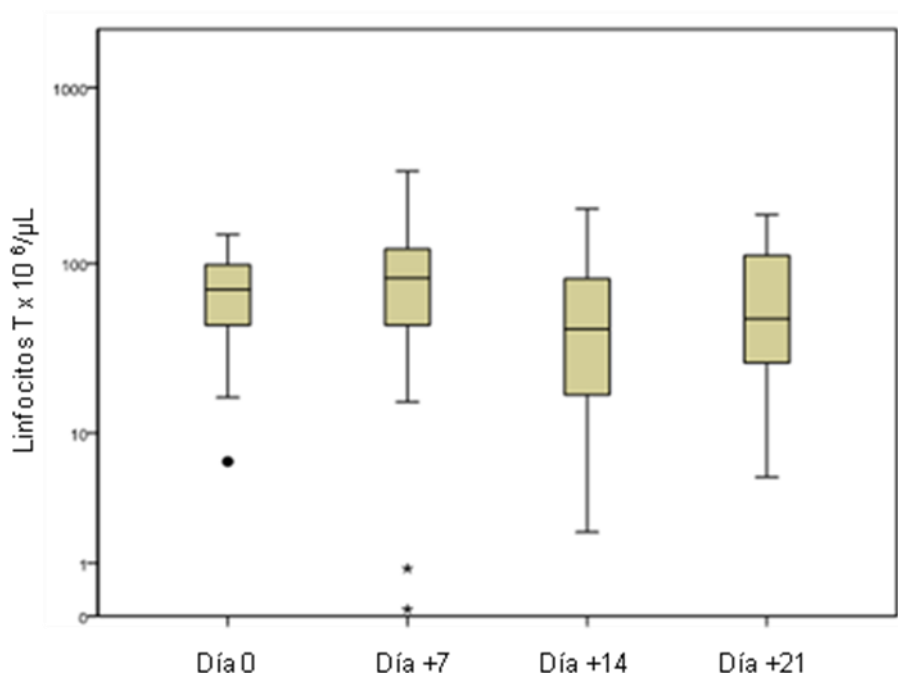


Figura 19: Evolución de los LT en cultivo

2.4.- Células NKT.

La media de células NKT en el día 0 fue de $4,22 \pm 3,95 \times 10^6$ (3,47% \pm 3,13%) aumentando hasta $51,67 \pm 103,41 \times 10^6$ (7,46% \pm 12,76%) en el día +14 y $128,77 \pm 235,15 \times 10^6$ (7,57% \pm 7,68%) en el día +21.

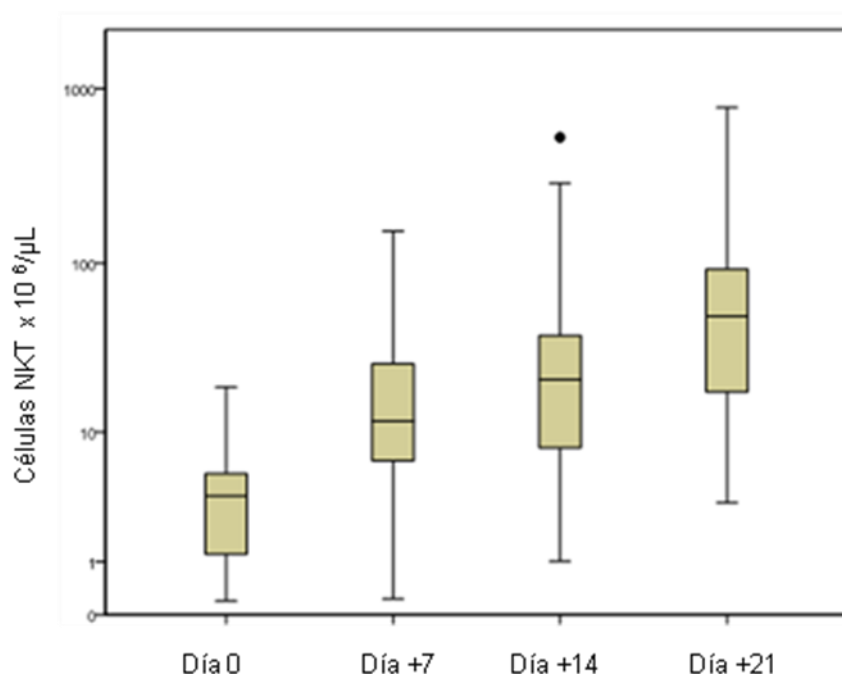


Figura 20: Evolución de las células NKT en cultivo

En la figura 21 se representa de forma gráfica la evolución de la cinética de las poblaciones linfocitarias NK, LT y NKT en los diferentes días de cultivo. Se observa como la población de células NK experimenta una notable expansión hasta el día +14 de cultivo, con estabilización posterior. Respecto a los LT y células NKT se observa una curva más plana con tendencia descendente en caso de los LT y ascendente en el caso de las NKT. En el día +21 se representan sólo los datos del ensayo LLAT, ya que en Lydia estos datos no son valorables al existir manipulación.

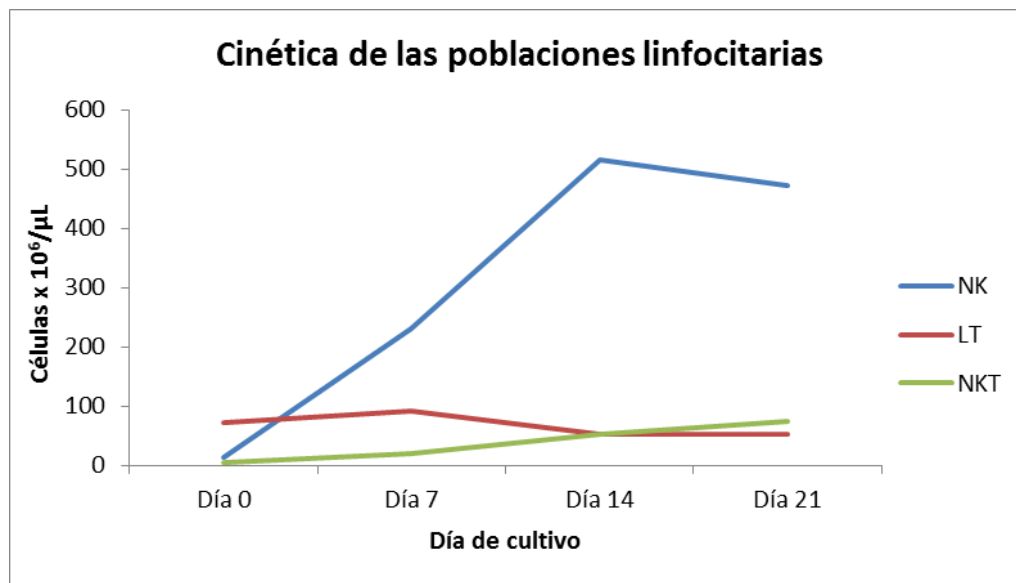


Figura 21: Cinética de las poblaciones linfocitarias NK, LT y NKT en los diferentes días de cultivo

2.5.- Distribución de las poblaciones celulares.

Respecto al promedio de células totales presentes en los cultivos en los días 0, +7, +14 y +21, las poblaciones linfocitarias quedan distribuidas como se representa en la tabla 8 y figura 22.

Tabla 8: Distribución de las poblaciones celulares en los días de cultivo

	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
Células totales/μL	131,22x10 ⁶	389,78x10 ⁶	639,78x10 ⁶	631,83x10 ⁶
NK (%)	9,14	60,42	79,93	77,28
LT (%)	55,85	21,27	9,71	9,48
NKT (%)	3,47	4,73	7,46	10,39

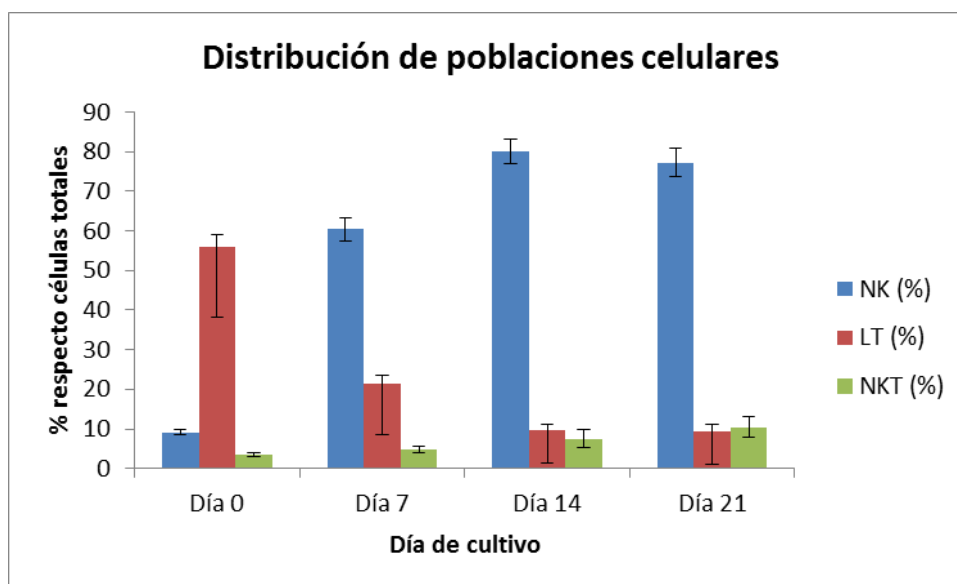


Figura 22: Distribución de las poblaciones celulares en los distintos días de cultivo

2.6.- Viabilidad de los productos.

En la tabla 9 se recogen los datos de las medias de viabilidad de los productos en los distintos días de cultivo.

Tabla 9: Viabilidad en los distintos días de cultivo

Días	%
0	94,58 ± 9,57
7	65,68 ± 18,26
14	74 ± 19,65
21	79,45 ± 30

2.7.- Expansión de las poblaciones celulares.

Las medias de los ratios de expansión en los días +7 y +14 de cultivo en todos los procedimientos realizados se recogen en la tabla 10 y se representan gráficamente en la figura 23. Se puede observar la expansión de las tres poblaciones linfocitarias. Todas ellas experimentan expansión con el cultivo si bien en el caso de los LT la expansión fue mínima.

Tabla 10: Expansión de las poblaciones celulares

Ratios de expansión (Media \pm DS)	Semana 0-1 Día 7	Semana 0-2 Día 14
NK	24,71 \pm 18,54	63,52 \pm 67,81
LT	1,52 \pm 1,44	1,33 \pm 2,61
NKT	16 \pm 32,28	29 \pm 51,4

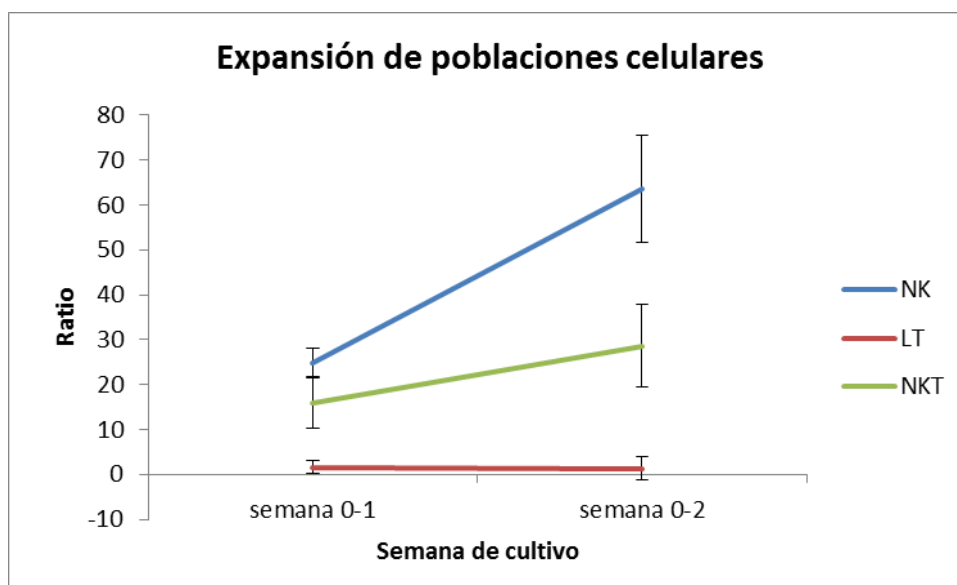


Figura 23: Expansión de las poblaciones celulares en los distintos días de cultivo

Los ratios de expansión de las poblaciones celulares en el día +21 de cultivo sólo son valorables en los procedimientos realizados en LLAT porque en Lydia, al haber manipulación entre los días + 14 y +21 de cultivo por la infusión, este resultado no es válido. Se exponen, por tanto, por separado (Tabla 11).

Tabla 11: Expansión de las poblaciones celulares en LLAT

Ratios de expansión LLAT (media \pm ET)	Semana 0-1 Día 7	Semana 0-2 Día 14	Semana 0-3 Día 21
NK	27,55 \pm 7	106,3 \pm 32	147,31 \pm 54
LT	1,73 \pm 0,6	2,22 \pm 1	2,88 \pm 1
NKT	12,62 \pm 6	35,4 \pm 15	50,22 \pm 20

2.8.- Fallos de expansión.

En el ensayo LLAT de las 12 expansiones realizadas se produjeron 2 fallos de expansión y en el ensayo Lydia de las 22 expansiones realizadas se detectaron 4 fallos.

2.9.- Análisis microbiológico.

Los análisis microbiológicos fueron negativos en todos los casos excepto en uno de los productos que tuvo que ser descartado por presentar contaminación bacteriana.

2.10.- Análisis molecular de seguridad.

En ninguno de los productos se detectó expresión de c-Myc ni de TERT. Tampoco se detectaron aberraciones cromosómicas por *microarrays*. Además, tras la primera semana de cultivo no se detectó expresión de BCR-ABL indicando que en el producto infundido no se incluyen células K562-mb15-41BBL.

En la figura 24 se representa el perfil genético de los productos NKAЕ. La expresión de BCR-ABL y de TERT disminuye con los días de cultivo mientras que la expresión de c-Myc varía siendo en el producto final igual al basal.

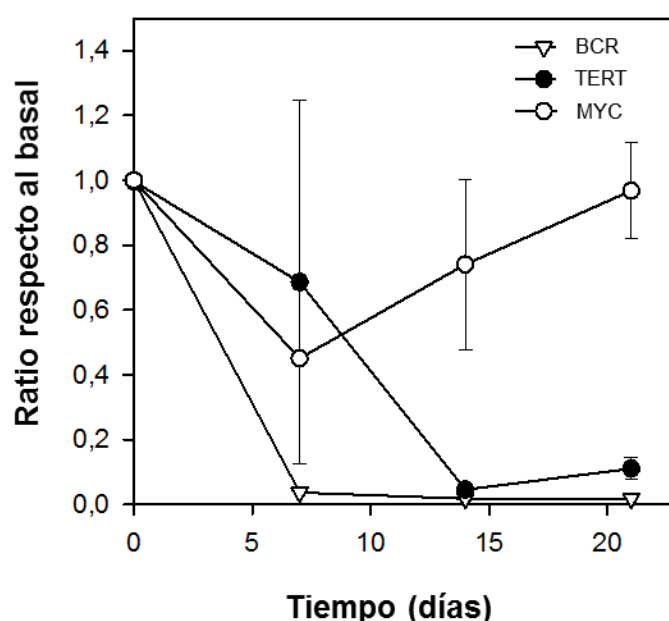


Figura 24: Perfil genético de los productos NKAЕ

2.11.- Características fenotípicas del producto NKAЕ por citometría de flujo.

En la figura 25 se muestran datos representativos de las características fenotípicas analizadas por citometría de flujo en los distintos días de cultivo.

Resultados

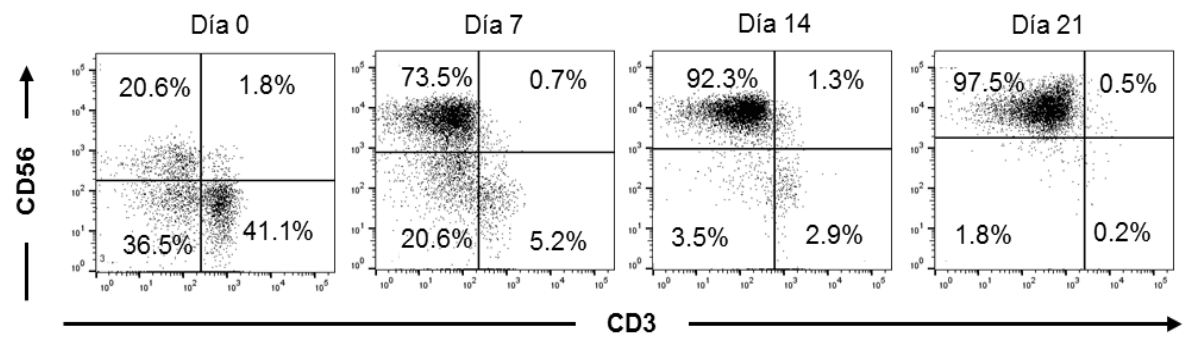


Figura 25: Características morfológicas del producto NKAЕ por citometría de flujo

3.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES.

En este apartado se recogen los cambios fenotípicos que se presentan en los productos NK-IL15 y NKAЕ respecto a las células NK basales. En ambos productos se analizaron los receptores activadores (NKG2D, NKp44, NKp46, NKp30, DNAM-1) y los marcadores de activación (CD25 y CD69). En la tabla 12 se muestran las medias del porcentaje de expresión de cada receptor analizado. Estos datos se representan gráficamente en la figura 26.

Tabla 12: Expresión de receptores en NK basales, NKAЕ y NK-IL15

Receptor	NK basal	NKAЕ	NK-IL15	NK-IL15 vs NKAЕ (p)
CD69	21,54 ± 13,97	87,96 ± 12,79	64,40 ± 5,92	0,01*
CD25	10,43 ± 7,56	56,17 ± 13,59	21,48 ± 6,52	0,002*
NKG2D	83,37 ± 5,66	92,49 ± 7,11	90,30 ± 7,60	0,66
DNAM-1	71,18 ± 17,05	85,48 ± 9,54	79,25 ± 4,90	0,28
NKp44	30,37 ± 12,96	50,73 ± 10,56	64,85 ± 7,64	0,06
NKp46	47,99 ± 6,21	82,28 ± 12,51	80,00 ± 8,02	0,76
NKp30	49,61 ± 11,90	75,47 ± 14,68	84,10 ± 4,78	0,30

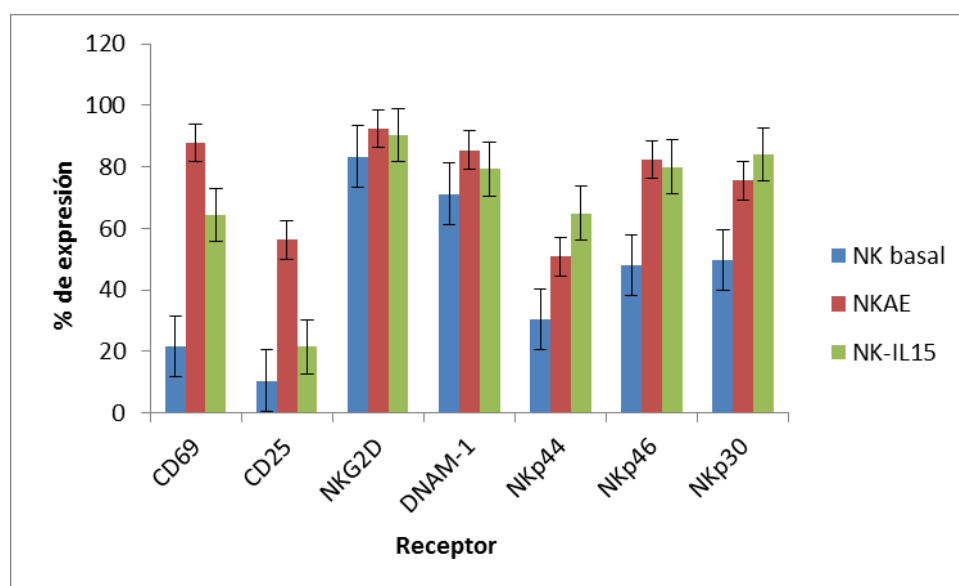


Figura 26: Expresión de receptores en NK basales, NKAЕ y NK-IL15

Comparando ambos productos, se ha observado una mayor expresión de CD69 y CD25 estadísticamente significativa en NKAЕ respecto a NK-IL15 ($p=0,01^*$ y $p=0,002^*$ respectivamente). En los demás receptores estudiados no se alcanza la significación estadística, pero se observa que la expresión es mayor en NKAЕ que en NK-IL15 excepto en NKp44.

En el producto NKAЕ, se observa una expresión aumentada de los receptores y marcadores de activación, al igual que del receptor de citoquinas. Los receptores inhibidores disminuyen su expresión excepto KIR2DS4 y NKG2A.

El porcentaje de expresión fue significativamente mayor en NKAЕ respecto a NK basal en: CD69 ($p=0,0001^*$), CD25 ($p=0,00021^*$), NKG2D ($p=0,05^*$), NKp44 ($p=0,03^*$), NKp46 ($p=0,0006^*$) y NKp30 ($p=0,016^*$). No alcanzó la significación estadística en DNAM-1 ($p=0,14$).

En NK-IL15 se observa, del mismo modo que con NKAЕ, una expresión aumentada de los receptores activadores en el producto final, al igual que de los marcadores de activación. El receptor inhibidor estudiado en este caso aumenta su expresión en el producto final (NKG2A).

El porcentaje de expresión fue significativamente mayor en NK-IL15 respecto a NK basal en: CD69 ($p=0,0008^*$), CD25 ($p=0,05^*$), NKp44 ($p=0,002^*$), NKp46 ($p=0,00026^*$) y NKp30 ($p=0,001^*$). En NKG2D y DNAM-1 no alcanzó la significación estadística ($p=0,16$ y $0,39$ respectivamente).

Por tanto, la expresión de los receptores activadores CD69, CD25, NKp44, NKp46, NKp30, NKG2D y DNAM-1 es mayor tanto en NKIL15 como en NKAЕ comparado con NK basales. Las NKAЕ expresan mayor cantidad de estos receptores activadores que las NKIL-15.

Datos representativos por citometría de flujo de la expresión de los distintos receptores en ambos productos se recogen en la figura 27:

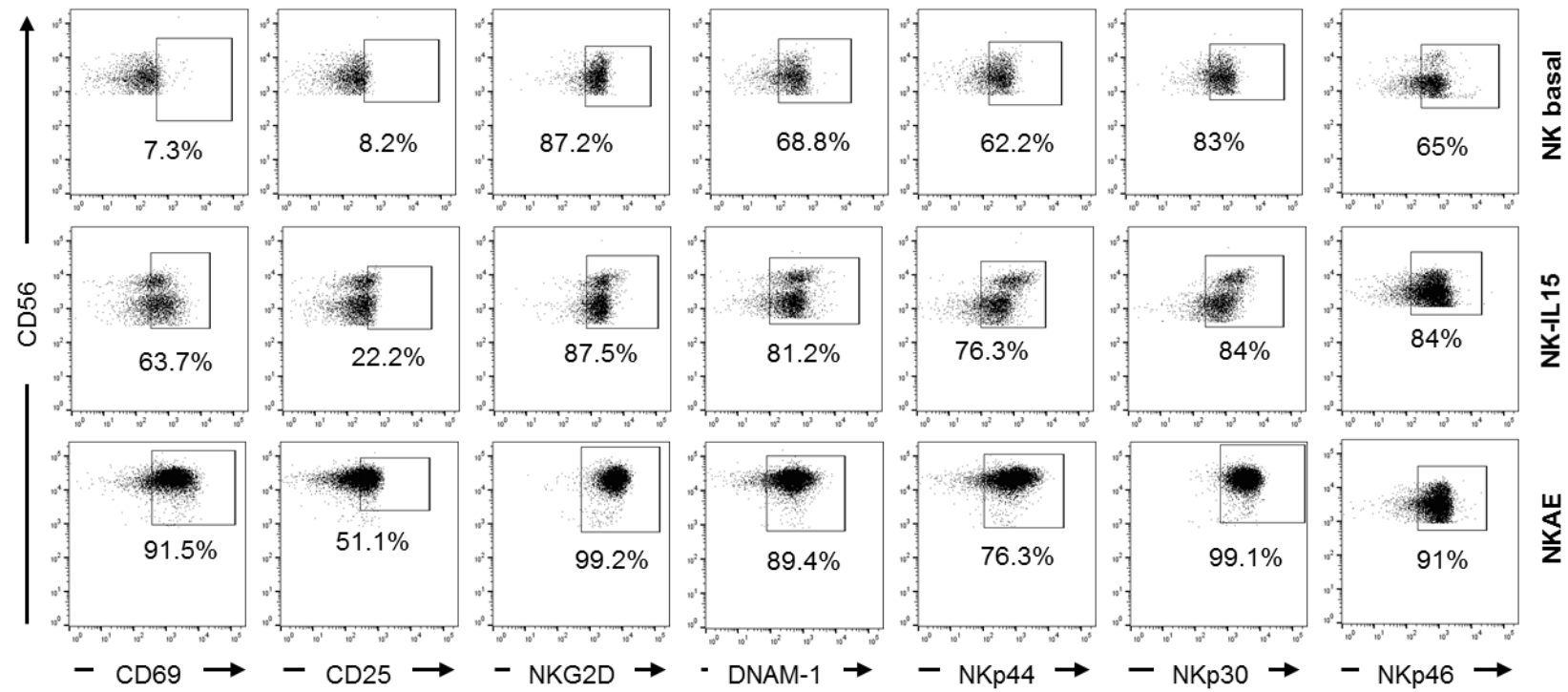


Figura 27: Datos representativos de la expresión de receptores en NK basales, NK-IL15 y NKAE

4.- CITOTOXICIDAD DE LOS PRODUCTOS NKIL-15 Y NKAЕ.

En la figura 28 se representan las medias de la citotoxicidad.

Los productos NKIL-15 y NKAЕ presentan mayor capacidad citotóxica que las células NK basales en todos los ratios, con una diferencia estadísticamente significativa para el ratio 8:1 ($p=0,025^*$ y $p=0,00026^*$, respectivamente). Comparando ambos productos, se observa que los productos NKAЕ tienen una actividad citotóxica mayor que NK-IL15, con diferencias estadísticamente significativas en el ratio 8:1 para los cuatro productos comparados ($p=0,001^*$, $p=0,04^*$, $p=0,00096^*$, $p=0,0024^*$, respectivamente).

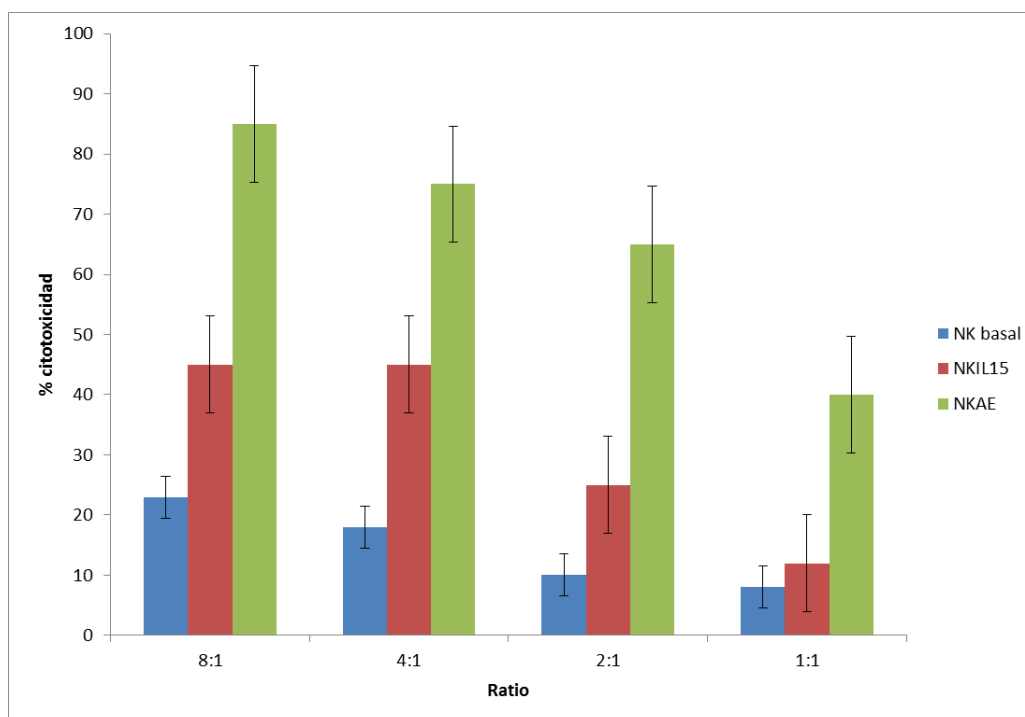


Figura 28: Actividad citotóxica de los productos finales para los ratios 8:1, 4:1, 2:1 y 1:1. NKAЕ y NK-IL15 presentan mayor actividad citotóxica que las NK basales

5.- RESULTADOS CLÍNICOS DEL ENSAYO CON NK-IL15: “Trasplante haploidéntico e infusión de células NK estimuladas con IL-15 en pacientes con tumores sólidos refractarios”.

5.1.- Características epidemiológicas de los pacientes.

Se reclutaron 6 pacientes entre febrero de 2011 y julio de 2013.

Las características epidemiológicas y clínicas se muestran en la tabla 13.

Todos los pacientes cumplían los criterios de inclusión descritos en el protocolo del ensayo y firmaron el consentimiento informado.

Se realizaron un total de 8 infusiones: 4 pacientes (66,6%) recibieron 1 infusión y 2 pacientes (33,3%) recibieron 2 infusiones debido a la buena respuesta clínica tras la primera infusión.

Se incluyeron tres pacientes con sarcoma de Ewing refractario al tratamiento, un sarcoma indiferenciado refractario, un osteosarcoma metastásico y un carcinoma suprarrenal refractario.

Tabla 13: Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes incluidos en el ensayo NK-IL15

Paciente	Sexo	Edad (años)	Diagnóstico	Tratamiento previo	Estado preTPH
1	V	15	Sarcoma Ewing peroné + metástasis pulmón/óseas	SEOP-EW01, T+I, G+D, T+I+RT	Enfermedad progresiva
2	M	11	Sarcoma indiferenciado sacro + metástasis pulmón	EpSSG RMS-2005+RT, To+C, cirugía, VCR+Cy, T+I, Cy+VP	Enfermedad progresiva
3	V	15	Osteosarcoma femur + metástasis pulmón	EURAMOS+cirugía, interferón B, If+VP	Enfermedad progresiva
4	M	15	Sarcoma Ewing sacroilíaco + metástasis pulmón/hígado/óseas	SEOP-EW01+HDCT+RT, T+I	Enfermedad progresiva
5	V	13	Carcinoma suprarrenal + ganglios peritoneales	Cirugía+RT+mitotane	Enfermedad progresiva
6	V	16	Sarcoma Ewing tibia + metástasis pulmón	SEOP-EW01+ RT, T+I	Enfermedad progresiva

5.2.- Características de los donantes y del injerto.

Las características de pacientes y donantes se resumen en la tabla 14.

Tabla 14: Disparidad KIR/HLA entre donantes y receptores

Paciente	Donante	KIR donante	HLA-1 paciente	Disparidad KIR-HLA
1	Madre	B (2DS1/2DS2/3DS1)	C1C2Bw4	No
2	Hermano	A	C1C2Bw4	No
3	Padre	No evaluado	C1C2Bw4	No
4	Padre	B (2DS2/3DS1)	C1C2Bw4	No
5	Madre	B (2DS2)	C1C2Bw4	No
6	Madre	A	C1C1BW6	Si (2DL1 y 3DL1)

En 2 pacientes el donante fue el padre (33,3%), en 3 pacientes fue la madre (50%) y en 1 paciente un hermano (16,6%). Tres donantes presentaron haplotipo KIR-B. En 5 pacientes hubo diferencia de sexo. Sólo en el paciente 6 se detectó disparidad HLA-I/KIR (KIR 2DL1/3DL1).

La media de células CD34+ infundidas fue de $3,05 \times 10^6/\text{kg}$ (rango $1,9\text{-}6,5 \times 10^6/\text{kg}$), con una media de LT de $9,7 \times 10^3/\text{kg}$ (rango $3\text{-}14 \times 10^3$), y de células NK de $31,44 \times 10^6/\text{kg}$ (rango $13\text{-}87 \times 10^6$). Se consiguió quimera completa (>95%) en 5 de los 6 pacientes (83,3%).

5.3.- Células NK-IL15 infundidas.

Se infundieron una mediana de $11,3 \times 10^6$ células NK-IL15/kg (rango $3\text{-}29 \times 10^6/\text{kg}$) con una pureza >90% (91,5%-97,8%). En cuanto a la cantidad de LT infundidos fue menor de $1 \times 10^3/\text{kg}$ en todos los casos ($0\text{-}0,75 \times 10^3/\text{kg}$). Cabe destacar que en 7 de las 8 infusiones se consiguió la ausencia absoluta de LT. Todos los productos presentaban una viabilidad mayor del 90% (90,4%-100%).

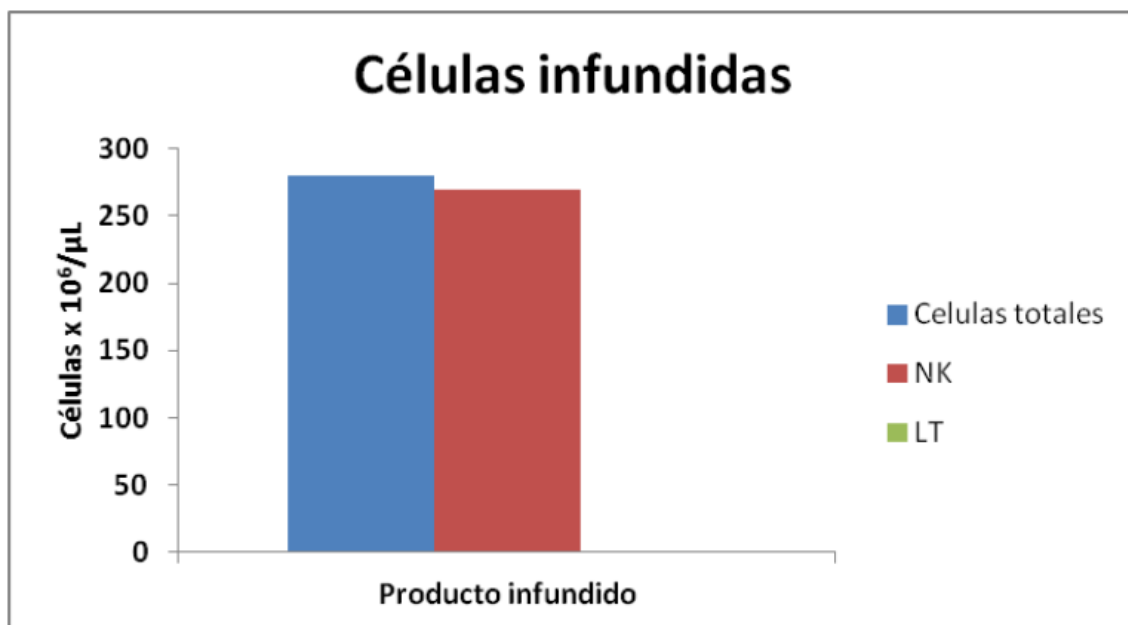


Figura 29: Número de células totales, NK y LT infundidos

5.4.- Evaluación de la toxicidad.

1) Toxicidad por infusión de NK-IL15

La infusión del producto NK-IL15 fue bien tolerada en todos los casos y no se observaron efectos adversos de ningún tipo.

Los pacientes 1 y 2 recibieron una segunda infusión de NK-IL15 que también fue bien tolerada.

2) Toxicidad secundaria a TPH haploide

Todos los pacientes presentaron pancitopenia, precisando una media de 3 transfusiones de hematíes (rango 1-7) y 3 transfusiones de plaquetas (rango 1-8). La neutropenia severa tuvo una duración media de 9 días (rango 6-14 días). El injerto leucocitario fue rápido, con una media de 13 días (rango 11-15 días) y se consiguió el injerto plaquetario con una media de 11 días (rango 9-15 días).

Los pacientes precisaron una media de 20 días de ingreso hospitalario (rango 12-52 días).

Previo a la infusión de NK-IL15, 3 pacientes desarrollaron EICR agudo > grado II. En ellos, se mantuvo la inmunosupresión y el grado de EICR no se modificó tras la infusión.

En la tabla 15 se resumen el resto de efectos adversos observados. Todos ellos ocurrieron previamente a la infusión de NK-IL15 y no se agravaron con la

misma. El paciente 6 presentaba microangiopatía trombótica asociada al régimen de acondicionamiento que había recibido previo al TPH, que no se modificó con la infusión.

Tabla 15: Efectos adversos registrados durante el ensayo con NK-IL15

Paciente	Complicaciones postTPH
1	Neutropenia febril
2	Neutropenia febril/EICR agudo grado III
3	Bacteriemia <i>E. faecium</i> /Diarrea por Rotavirus/EICR agudo grado III/CMV
4	Cistitis hemorrágica
5	EICR agudo grado III
6	Microangiopatía trombótica/EICR agudo grado II/CMV/Adenovirus/VHS-6

5.5.- Evaluación de la respuesta y seguimiento de los pacientes.

En la tabla 16 se recoge la evolución de cada paciente.

Tabla 16: Respuesta al tratamiento y supervivencia

Paciente	Respuesta	Estado actual	Tiempo de supervivencia (días)
1	Muy buena remisión parcial	Fallecido (progresión)	313
2	Remisión parcial	Fallecido (progresión)	772
3	Enfermedad estable	Fallecido (progresión)	115
4	Enfermedad progresiva	Fallecido (progresión)	39
5	No evaluado	Fallecido (toxicidad TPH)	87
6	Remisión parcial	Fallecido (toxicidad TPH)	103

Un paciente (paciente #1) consiguió una muy buena remisión parcial tras 10 meses y 2 pacientes remisión parcial tras 14 y 4 meses respectivamente (pacientes #2 y #6). Un paciente (paciente #3) consiguió estabilización de la enfermedad tras 4 meses (no modificación del tamaño de las lesiones) y 1 paciente (paciente #4) progresó durante el segundo mes postTPH. No se pudo

evaluar la respuesta del paciente número 5 debido a que se trasladó de hospital por EICR severo. La mejor respuesta clínica se observó en las metástasis pulmonares.

Todos los pacientes fallecieron con una mediana de 310 días (rango 39-772). Cuatro pacientes (66,6%) debido a progresión de su enfermedad de base y 2 (33,3%) por complicaciones derivadas del TPH: uno por EICR y otro por microangiopatía trombótica asociada al TPH.

En la figura 30 se muestran las imágenes de los TAC realizados a los pacientes #1, #2, #3 y #6, previo al TPH, en los días +30 y +90 tras la infusión de NK-IL15 y las imágenes de la progresión de las metástasis pulmonares. Los pacientes #1, #2 y #6 presentaron una respuesta parcial, con reducción del tamaño de los nódulos pulmonares en lóbulo inferior derecho (#1 y #6) y lóbulo inferior izquierdo (#2), que posteriormente progresaron. El paciente #3 no presentó cambios en el tamaño de las metástasis durante el seguimiento.

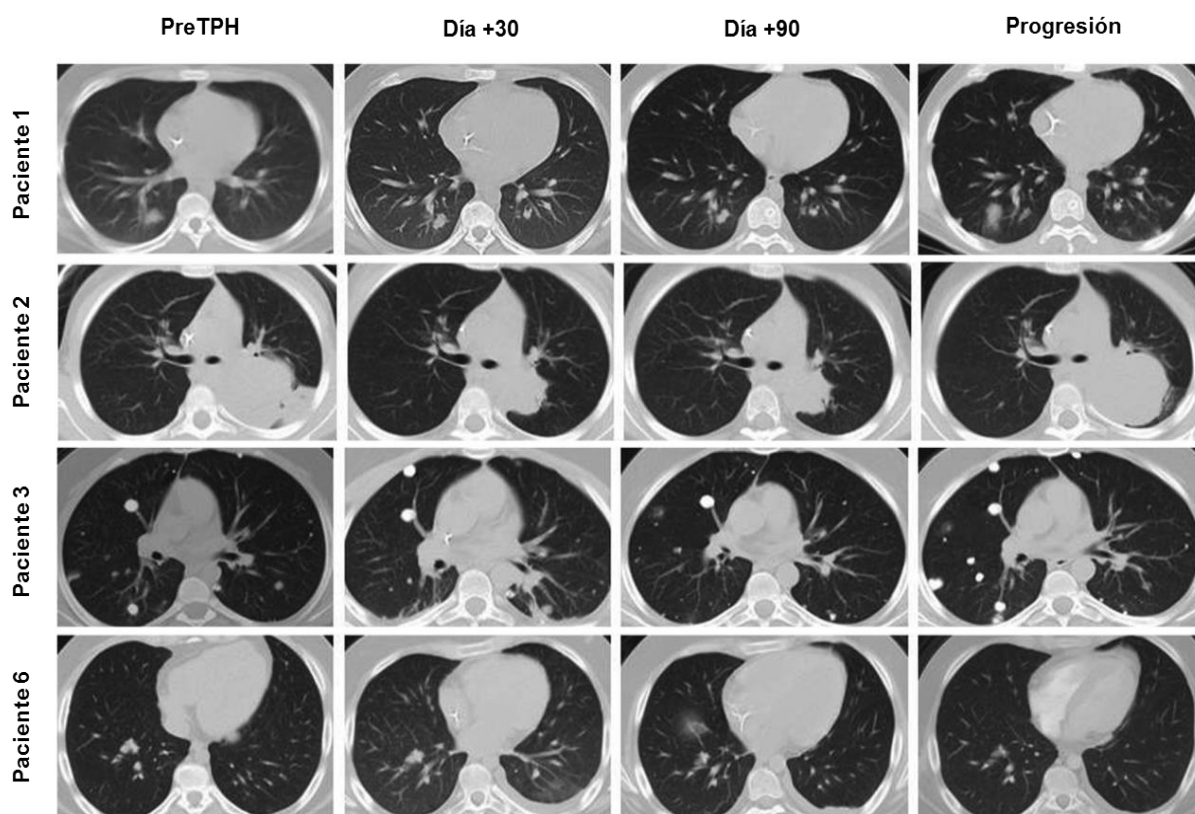


Figura 30: Evaluación de la respuesta en los pacientes #1, #2, #3 y #6

6.- RESULTADOS CLÍNICOS DE LOS ENSAYOS CON NKAЕ: “LLAT: Infusión de células NK en combinación con quimioterapia en pacientes pediátricos con leucemia/linfoma T refractaria” y “Lydia: Inmunoterapia con células NK activadas y expandidas junto con quimioterapia de rescate en el niño con leucemia aguda en recaída o refractariedad.”

6.1.- Características epidemiológicas de los pacientes.

Se reclutaron 20 pacientes, 7 participaron en el estudio LLAT y 13 en el proyecto Lydia.

Las características epidemiológicas, clínicas y la quimioterapia de rescate administrada a cada paciente se muestran en la tabla 17.

El 55% de los pacientes eran varones y el 45% mujeres, razón varón/mujer 1,22; con una edad media de 12,07 años \pm 5,76 (rango 1-23).

El diagnóstico fue LLA-B en 5 pacientes (25%), LLA-T en 5 (25%), LMA en 6 pacientes (30%), leucemia-linfoma T en 3 pacientes (15%) y 1 leucemia aguda bifenotípica (5%). En el ensayo LLAT se incluyeron 2 pacientes con linfoma T y en el ensayo Lydia 1 paciente.

Diez pacientes (50%) se encontraban en situación de recaída y 10 pacientes (50%) en situación de refractariedad. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución de enfermedades entre ambos ensayos (p 0,27).

Todos los pacientes cumplían los criterios de inclusión descritos en los protocolos de los ensayos y se firmó el consentimiento informado.

Diez pacientes (50% en total; 57,1% en LLAT y 46,2% en Lydia) habían recibido previamente un TPH con distintas fuentes como se especifica en la tabla 17.

Tabla 17: Características epidemiológicas de los pacientes de LLAT/Lydia

Paciente	Sexo	Edad (años)	Diagnóstico	TPH previo	Quimioterapia de rescate
1	V	19	Recaída LLA-T postTPH	No familiar no idéntico	Ara-G/VP/Cy
2	M	6	Recaída LLA-T postTPH	Familiar idéntico	Ara-G/VP/Cy
3	M	3	LLA-T refractaria	No	Ara-G/VP/Cy
4	V	15	LLA-T refractaria	No	Ara-G/VP/Cy
5	M	16	Leucemia-Linfoma T refractario postTPH	2 familiar idéntico	Ara-G/VP/Cy
6	V	10	LLA-T refractario postTPH	Familiar idéntico	Ara-G/VP/Cy
7	M	11	Recaída leucemia-Linfoma T	No	Ara-G/VP/Cy
8	V	18	LLA-B refractaria	No	CLOVE
9	V	14	Recaída LLA-B postTPH	Haploidéntico	CLOVE
10	M	4	Recaída LMA secundaria postTPH	No familiar idéntico/Haploidéntico	IDA-Flag
11	V	15	Leucemia bifenotípica refractaria	No	IDA-Flag
12	V	23	LMA refractaria	No	CLOVE
13	V	13	LMA refractaria	No	Flu-Cy
14	M	9	Recaída LMA	No	Flu-Cy
15	M	16	Recaída LLA-T postTPH	2 familiares idénticos	Flu-Cy
16	M	9	Recaída LMA	No	CLOVE
17	V	17	LLA-B refractaria postTPH	Haploidéntico	Flu-Cy
18	V	1	Recaída LLA-B postTPH	Donante no familiar idéntico (cordón)	IDA-Flag
19	M	12	LLA-B refractaria	No	CLOVE
20	V	10	Recaída LMA postTPH	Haploidéntico	CLOVE

6.2.- Células infundidas.

Se realizaron un total de 51 infusiones: Tres pacientes (15%) recibieron 1 infusión, 6 pacientes (30%) recibieron 2 infusiones y 9 pacientes (45%) recibieron 4 infusiones. En 2 pacientes (10%) no se pudo realizar ninguna infusión. En la tabla 18 se muestran el número de infusiones realizadas a cada paciente así como la cantidad total de NKAЕ y LT recibidos por peso.

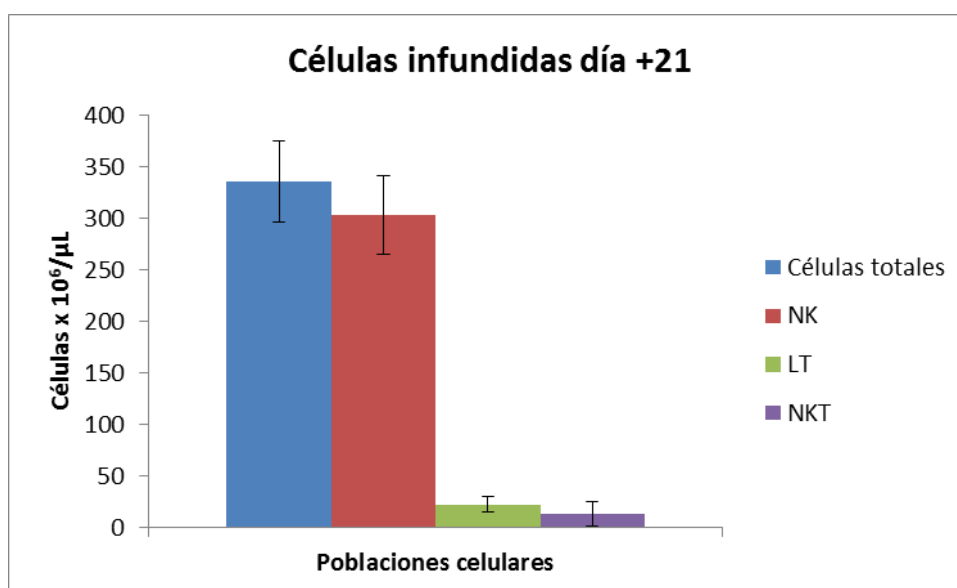
Tabla 18: Número de infusiones realizadas a cada paciente, cantidad total de NKAЕ y LT recibidos

Nº paciente	Nº infusiones	Total NKAЕ infundidas (10 ⁶ /kg)	Total LT infundidos (10 ⁶ /kg)
1	1	6,4	0
2	2	37,5	0
3	1	26,7	0
4	2	16,1	1,4
5	2	25,5	1,6
6	2	30,6	1
7	1	3	0,8
8	2	17,2	0,1
9	0	--	--
10	4	66,3	1,1
11	4	7,8	0,9
12	0	--	--
13	4	17,2	1,7
14	4	41,3	2,6
15	4	31,7	2,4
16	4	42	7,6
17	4	31,7	1,5
18	4	31	28,2
19	2	12,2	1
20	4	31,8	1

El 85,4% de células infundidas correspondieron a células NK, el 7,3% a LT y el 3,7% a células NKT. En la tabla 19 y en la figura 31 se recogen los datos globales de los productos infundidos.

Tabla 19: Características de los productos infundidos

	Media (rango)
Células totales ($\times 10^6$)	335,6 (65,3-921)
NK ($\times 10^6$)	302,9 (16,8-853,8)
% NK	85,4 (42,9-99)
LT ($\times 10^6$)	22,6 (0-175)
% LT	7,3 (0-37)
NKT ($\times 10^6$)	13,8 (0-350,3)
% NKT	3,7 (0-28,3)

**Figura 31:** Representación de las medias y DS de las células infundidas en el día +21

6.3.- Características de los donantes.

Para la producción de NKAЕ se seleccionó un donante sano haploidéntico. Como se ha señalado previamente, en dos pacientes no se llegó a realizar ninguna infusión. De los 18 pacientes que la recibieron, el donante fue el padre en 10 de ellos (55,5%), en 7 pacientes fue la madre (38,8%) y en 1 paciente un hermano (5,5%). En los pacientes que no pudieron recibir infusión, el donante iba a ser una hermana.

En los 18 donantes, se realizó análisis del haplotipo KIR. La disparidad KIR/HLA y la presencia de haplotipo KIR-B se recoge en las tablas 20 y 21.

- 9 donantes (50%) no presentaban disparidad KIR/HLA con los receptores.

- En el 50% restante, 5 donantes (27,8%) presentaban diferencia en KIR2DL1, 2 (11,1%) en KIR2DL2/3 y 2 (11,1%) en KIR3DL1.

Tabla 20: Disparidad KIR/HLA receptor/donante

Disparidad KIR-HLA	LLAT	Lydia	Total
No	3	6	9 (50%)
KIR2DL1	2	3	5 (27,8%)
KIR2DL2/3	0	2	2 (11,1%)
KIR3DL1	2	0	2 (11,1%)

- Se analizó la presencia del haplotipo KIR-B en 14 muestras, estando presente en 11 donantes (78,6%) con distribución según “score de Cooley” como se muestra en la tabla 21.

Tabla 21: “Score de Cooley” calculado para los donantes

KIR-B	LLAT	Lydia	Total
No	1	2	3 (21,4%)
“Neutral”	2	0	2 (14,3%)
“Better”	0	5	5 (35,7%)
“Best”	1	3	4 (28,6%)

6.4.- Desarrollo de los ensayos.

En la figura 32 está representado el diagrama de flujo de los ensayos LLAT y Lydia.

Resultados

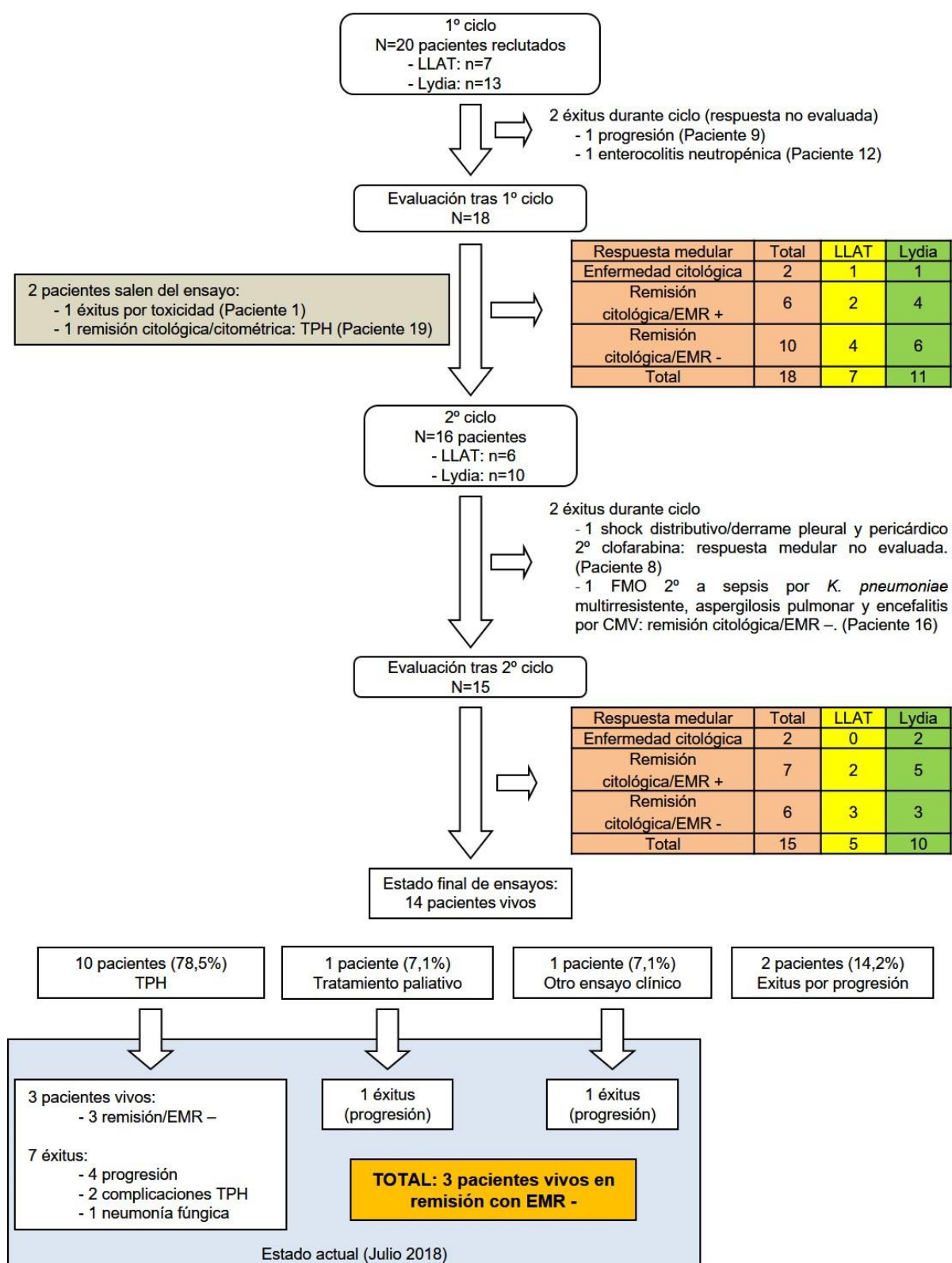


Figura 32: Diagrama de flujo de los ensayos LLAT/Lydia

6.5.- Evaluación de la toxicidad.

Los pacientes precisaron una media de 31 días de ingreso hospitalario (rango 10-64 días), sin presentar diferencias significativas entre ambos ensayos ($p=0,54$).

1) Toxicidad por infusión de NKA

La infusión del producto NKA y la administración posterior de IL-2 subcutánea ocasionó efectos adversos en 6 pacientes (33,3%), todos ellos leves. El efecto adverso más frecuente fue la fiebre (15%). Ninguno de los pacientes presentó repercusión hemodinámica en relación con la fiebre, cediendo con antitérmico habitual.

- En el ensayo LLAT, 2 pacientes presentaron fiebre. No se registró ningún otro tipo de toxicidad.
- En el ensayo Lydia:
 - Cuatro pacientes presentaron toxicidad en el día +14. De ellos, 1 paciente presentó fiebre tras la infusión, 2 presentaron febrícula y 1 paciente presentó reacción local en relación con la administración de IL-2 subcutánea.
 - En el día +21, ninguna infusión presentó toxicidad.
 - No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los días +14 y +21 (test exacto de Fisher 0,48).

2) Toxicidad por ciclo de tratamiento

El 73,5% de los pacientes presentó algún tipo de toxicidad.

- Tras el primer ciclo de tratamiento, presentaron toxicidad 15 pacientes de los 20 evaluados (75%).
- Tras el segundo ciclo de tratamiento, presentaron toxicidad 10 pacientes de los 14 evaluados (71,4%).

En LLAT un 83,3% de los pacientes presentaron algún tipo de toxicidad.

- Tras el primer ciclo de tratamiento, presentaron toxicidad 6 pacientes (85,7%).
- Tras el segundo ciclo de tratamiento, presentaron toxicidad 4 pacientes (80%).

Resultados

- No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de pacientes (test exacto de Fisher: $p=1,00$).

En Lydia un 68,2% de los pacientes presentaron algún tipo de toxicidad.

- Tras el primer ciclo de tratamiento, presentaron toxicidad 9 pacientes (69,2%).
- Tras el segundo ciclo de tratamiento, presentaron toxicidad 6 pacientes (66,7%).
- No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de pacientes (test exacto de Fisher: $p=1,00$).

Todos los efectos adversos fueron de grado I-II excepto los recogidos en la tabla 22.

Tabla 22: Efectos adversos > grado II en LLAT y Lydia

	LLAT	LYDIA
<i>Infecciones</i>		
Infección fúngica	1	4
Sepsis		2
Encefalitis CMV		1
<i>Alteraciones metabólicas</i>		
Síndrome de lisis tumoral		1
<i>Trastornos cardíacos</i>		
Taponamiento cardíaco		1
<i>Trastornos gastrointestinales</i>		
Enterocolitis neutropénica	1	1
<i>Trastornos sistémicos</i>		
Fallo multiorgánico		1

En el análisis estadístico no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de aparición de toxicidad entre primer y segundo ciclos (test exacto de Fisher: $p=1,00$).

Tampoco se encontraron diferencias significativas para la probabilidad de toxicidad respecto al número de ciclos que reciben los pacientes ($p=0,87$).

Sin embargo, sí se encontró significación estadística para la probabilidad de toxicidad respecto al tipo de quimioterapia administrada ($p=0,01^*$). Los pacientes que recibieron quimioterapia considerada de alta intensidad (todos los regímenes administrados excepto Flu/Cy) tienen mayor probabilidad de padecer algún tipo de toxicidad.

La toxicidad observada se puede clasificar en 5 grandes grupos que se exponen a continuación: neutropenia febril/bacteriemia, infecciones víricas, infecciones fúngicas, neutropenia severa y sintomatología neurológica.

1) Neutropenia febril/bacteriemia

Se recogieron un total de 22 episodios de neutropenia febril en 18 pacientes.

- En LLAT se registraron 10 episodios en 7 pacientes.
- En Lydia se registraron 12 episodios en 11 pacientes.
- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos ensayos (test exacto de Fisher: $p=0,44$).
- La neutropenia febril se presentó en el 100% de los pacientes que recibieron CLOVE o IDA-Flag, 67% de los que recibieron un régimen con nelarabina y 0% de los que recibieron Flu/Cy.

Todos los episodios se trataron con antibioterapia de amplio espectro previa recogida de hemocultivos.

Se detectó crecimiento bacteriano en 8 hemocultivos (36,3%). La bacteria más frecuentemente aislada fue *Staphylococcus epidermidis* en 4 casos (50%). Otras bacterias detectadas fueron 1 *Escherichia coli*, 1 *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, 1 *Pandoraea pnomenusa* y 1 *Capnocytophaga sputigena*. Además, en un paciente se detectó toxina de *Clostridium difficile* en heces y en otro paciente *Cryptosporidium*.

Presentaron infección bacteriana grave 4 pacientes (22,2%), 2 de ellos en forma de enterocolitis neutropénica y 2 como shock séptico, de los cuales fallecieron 2 pacientes (1 enterocolitis y 1 shock séptico por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente).

2) Infecciones víricas

Se documentaron un total de 7 infecciones víricas en 6 pacientes (38,8%), de las cuales 2 aparecieron en el LLAT y 5 en Lydia. Se detectó 1 caso de reactivación de virus Epstein-Barr (VEB), 1 reactivación de CMV, 2 casos de infección por virus herpes simple tipo 1 (VHS-1), 1 caso de poliomavirus (virus BK), 1 viremia por herpes virus tipo 6 (VHH-6) y 1 infección por Influenza B.

La infección más grave fue la reactivación de CMV, que ocasionó encefalitis y precisó tratamiento con ganciclovir y foscarnet, en un paciente con aspergilosis y sepsis por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, contribuyendo al fallo multiorgánico y el fallecimiento del paciente.

El resto de cuadros clínicos fueron leves y se resolvieron con tratamiento antiviral. El virus BK fue asintomático y no precisó tratamiento específico. La gripe B se trató con oseltamivir durante cinco días y el VHH-6 precisó tratamiento con aciclovir por acompañarse de elevación de transaminasas, ambos casos con buena evolución.

3) Infecciones fúngicas

Se registraron un total de 5 infecciones fúngicas en 5 pacientes (27,7%), de las cuales 1 apareció en LLAT y 4 en Lydia.

Cuatro de ellas fueron aspergilosis, aunque sólo en un caso se pudo identificar el tipo de *Aspergillus* en el lavado broncoalveolar (*A. flavus*). El resto fueron infecciones fúngicas invasivas probables sin confirmación microbiológica, con clínica y radiología compatibles. En 3 de los casos fueron la causa del fallecimiento de los pacientes.

El otro caso de infección fúngica fue una sospecha de candidiasis hepatoesplénica, que se resolvió con tratamiento antifúngico.

4) Neutropenia severa

Todos los pacientes incluidos en ambos ensayos presentaron neutropenia severa tras los ciclos de quimioterapia, a excepción de tres pacientes, uno en el LLAT y dos en Lydia.

Por tanto, se recogieron un total de 31 episodios de neutropenia severa, de los cuales 11 se produjeron en LLAT (35,4%) y 20 en Lydia (64,5%).

Siete pacientes (22,5%) no presentaron indicios de recuperación leucocitaria durante el seguimiento.

- 1 paciente participaba en LLAT. La falta de recuperación leucocitaria se relacionó con progresión de su enfermedad de base.
- 6 pacientes participaban en Lydia. Todos ellos presentaron progresión de su enfermedad de base a excepción de un paciente que falleció por complicaciones relacionadas con el ciclo, sin recuperación leucocitaria pese a tratamiento con factor estimulante de colonias, encontrándose en remisión.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la probabilidad de recuperación leucocitaria entre ambos ensayos (test exacto de Fisher 0,37).

La mediana de días hasta la recuperación leucocitaria fue de 20 días (IQR 27-9), sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos ensayos ($p=0,33$).

5) Efectos adversos neurológicos relacionados con la quimioterapia

Se recogieron 4 casos de efectos adversos neurológicos en relación con la quimioterapia (12,1%).

- En un caso (25%) se relacionó con la administración de triple terapia intratecal. El paciente presentó disminución del nivel de conciencia (Glasgow 12/15) tras la misma. Se resolvió en 48 horas sin secuelas con tratamiento basado en esteroides, ácido fólico y vitamina B.
- Tres pacientes (75%) presentaron sintomatología neurológica secundaria a la administración de nelarabina:
 - Un paciente presentó neuropatía en guante y calcetín, con parestesias e hiperalgesia, precisando tratamiento con gabapentina.
 - Un paciente presentó parestesias en plantas (toxicidad grado I), leves e intermitentes, que no precisaron tratamiento específico.
 - Un paciente que previamente había recibido irradiación corporal total como parte del acondicionamiento para TPH no emparentado no idéntico, presentó somnolencia severa que se relacionó con la causa del fallecimiento.

6.6.- Evaluación de la respuesta.

Todos los pacientes presentaban a su inclusión en el ensayo enfermedad detectable en la médula ósea, excepto los pacientes con linfoma linfoblástico T que presentaban enfermedad mediastínica.

En la figura 32 se puede observar la respuesta medular tras cada ciclo.

Tras primer ciclo de tratamiento, de los 18 pacientes evaluados, un total de 10 pacientes (55,5%) presentaron remisión citológica y citométrica y 6 (33,3%) persistencia de EMR. Dos pacientes (11,1%) permanecían con enfermedad citológica, 1 en LLAT y 1 en Lydia. Mediante el test exacto de Fisher no se

encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos ensayos, obteniendo una p de 1,00.

Tras segundo ciclo de tratamiento, se evaluaron 15 pacientes. De ellos, 6 pacientes (40%) presentaban remisión citológica y citométrica y 7 (46,6%) persistencia de EMR. Dos pacientes (13,3%) permanecían con enfermedad citológica. Uno de los pacientes con remisión citológica y citométrica falleció durante el ciclo. Mediante el test exacto de Fisher no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos ensayos, obteniendo una p de 1,00.

En el caso de los linfomas (n=3):

- En LLAT (n=2), uno de los pacientes no presentaba tejido tumoral viable tras el tratamiento y el otro paciente mejoró significativamente la infiltración a nivel del miocardio.
- En Lydia (n=1), el paciente presentó estabilidad en la captación a nivel de miocardio, con disminución en la captación de las adenopatías mediastínicas.

El **análisis cuantitativo** del porcentaje de blastos de la médula ósea de cada paciente se representa en la figura 33.

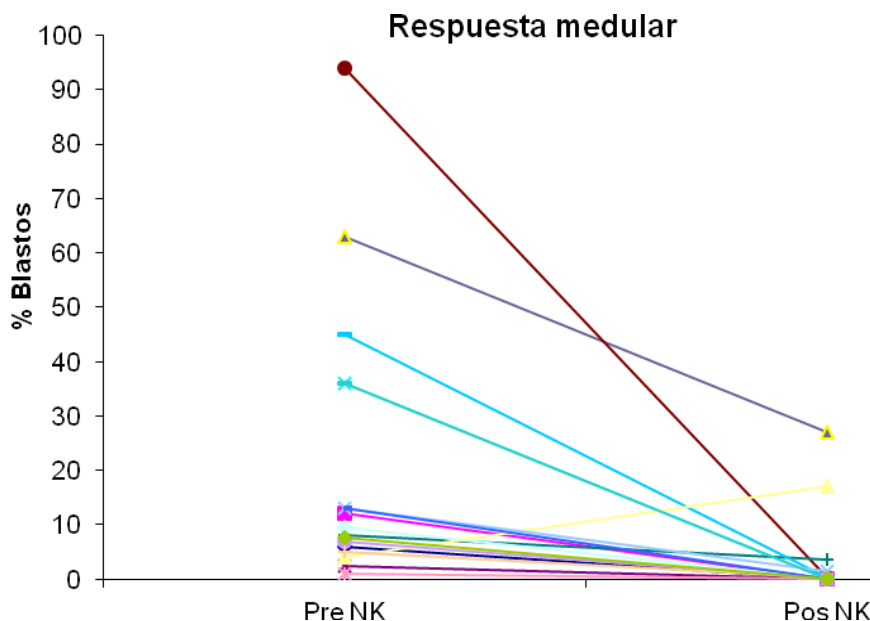


Figura 33: Porcentaje de blastos en médula ósea previamente y posterior a la terapia con NKA

La mediana de porcentaje de blastos en la evaluación inicial es de 15 (IQR 63-6). Tras ciclo 1 disminuye a 3 (4-2) y tras ciclo 2 desciende a 2 (14-0,00). (Figura 34).

La mediana de EMR inicial es de 12 (IQR 38,2-4), disminuyendo a 0 (0,36-0,00) tras primer ciclo y a 0,13 (2,06-0,00) tras segundo ciclo. (Figura 35).

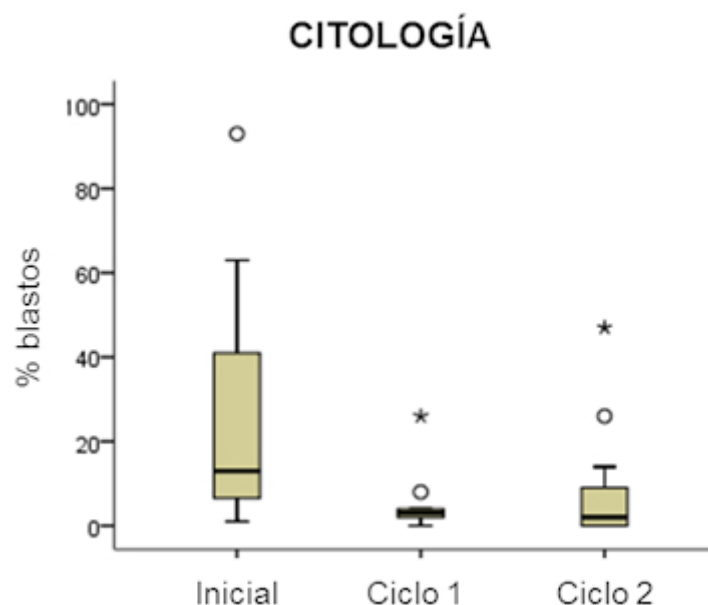


Figura 34: Porcentaje de blastos previo al tratamiento y tras ciclos 1 y 2

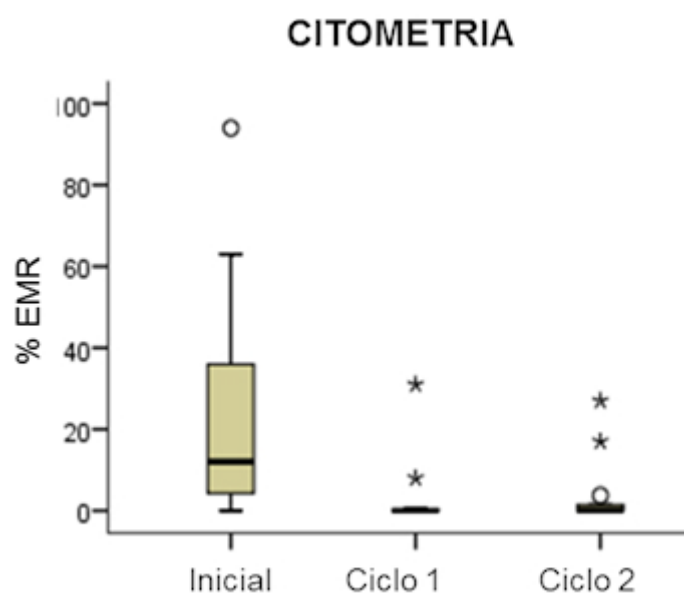


Figura 35: EMR previo al tratamiento y tras ciclos 1 y 2

Mediante pruebas no paramétricas (test de Friedman), se observa que el porcentaje de blastos y de EMR en la médula ósea previo al tratamiento es

significativamente mayor que tras los ciclos 1 y 2 con una $p=0,05^*$ para el porcentaje de blastos y una $p=0,002^*$ para enfermedad mínima residual.

Sin embargo, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la respuesta medular entre ciclos 1 y 2 con una $p=0,905$ para el análisis por citología y una $p=0,99$ para el análisis por citometría.

Se intentó correlacionar la respuesta con los picos de quimerismo detectados tras las infusiones. Se realizó análisis de quimerismo en 15 de los 18 pacientes infundidos.

- En 7 pacientes (46,7%) se detectaron células del donante, con picos de quimerismo 1-3%. Los valores máximos se muestran en la tabla 23. El paciente 16 alcanzó 95% de quimera del donante tras el segundo ciclo quimioterápico, probablemente debido a su severa mielosupresión. Se observó remisión con EMR negativa en 4 de estos pacientes (57,1%) al finalizar el ensayo.
- En 8 pacientes (53%) no se detectaron células del donante. De ellos, 3 alcanzaron remisión con EMR negativa al final del ensayo (37,5%).

Tabla 23: Pico de quimerismo alcanzado

Nº paciente	Pico de quimerismo del donante (%)
1	0
2	3
3	1
4	No realizado
5	2
6	0
7	0
8	1,6
10	0
11	No realizado
13	0
14	0
15	2
16	95
17	2
18	0
19	0
20	No realizado

- Por limitaciones de la muestra, sólo se pudo realizar quimerismo por subpoblaciones en 6 pacientes. Únicamente se detectaron células CD56+ procedentes de la infusión en 1 paciente que presentó 1% a las 24 horas, 0,5% a las 72 horas y 1,6% a los 4 días.
- En un paciente se detectó 2% de celularidad atribuible a la infusión semanas después de la misma. Este paciente había recibido un TPH siendo donante su hermano y posteriormente infusión de NKA-E siendo donante su padre.
- Tres pacientes con TPH previo presentaron una mejoría del quimerismo alcanzando quimera completa.
- No se observó correlación entre la respuesta y el quimerismo alcanzado (figura 36).

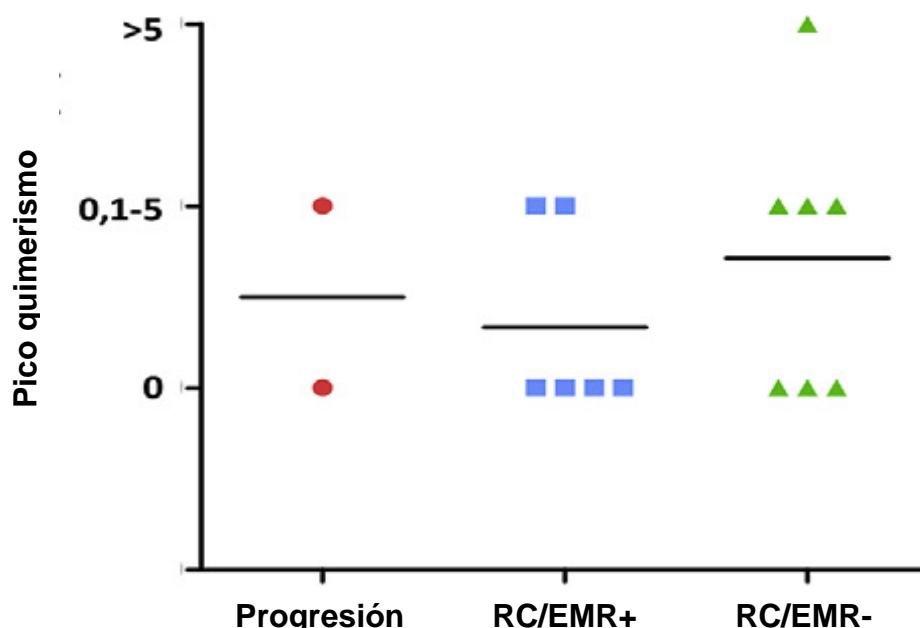


Figura 36: Relación entre el pico de quimerismo y la respuesta tumoral

6.7.- Seguimiento de los pacientes. Supervivencia.

El ensayo LLAT presentó una mediana de duración de 63 días (IQR 73-42) y el ensayo Lydia de 66 días (76-36).

En el momento de finalizar los ensayos, habían fallecido 6 pacientes (30%), de los cuales 2 participaban en LLAT y los 4 restantes en Lydia. Dos pacientes (33,3%) fallecieron por progresión de su enfermedad de base y 4 (66,6%) por toxicidad relacionada con el tratamiento: enterocolitis neutropénica (paciente #12); taponamiento cardíaco secundario a la administración de clofarabina (paciente #8); toxicidad neurológica por nelarabina (paciente #1) y sepsis por *K. pneumoniae* multirresistente (paciente #16).

Tras los ensayos, 10 pacientes recibieron un TPH, 1 paciente cuidados paliativos y 1 se incluyó en otro ensayo clínico.

De los receptores de TPH, 8 recibieron un TPH haploidéntico y 2 un TPH no emparentado idéntico. De ellos, 7 pacientes fallecieron, 4 por enfermedad progresiva y 3 por toxicidad relacionada con el trasplante.

En Julio de 2018, tres pacientes estaban vivos (sin evidencia de enfermedad), con una mediana de seguimiento de 880 días (rango 718-1185).

Por tanto, en el seguimiento fallecieron 17 pacientes en total (85%), de los cuales 6 habían participado en LLAT y 11 en Lydia. El 58,8% de las muertes se debió a progresión de la enfermedad de base y el 41,1% a complicaciones derivadas de los tratamientos administrados.

Las curvas de supervivencia (método de Kaplan-Meier) al final de los ensayos y en el momento actual se muestran en las figuras 37 y 38.

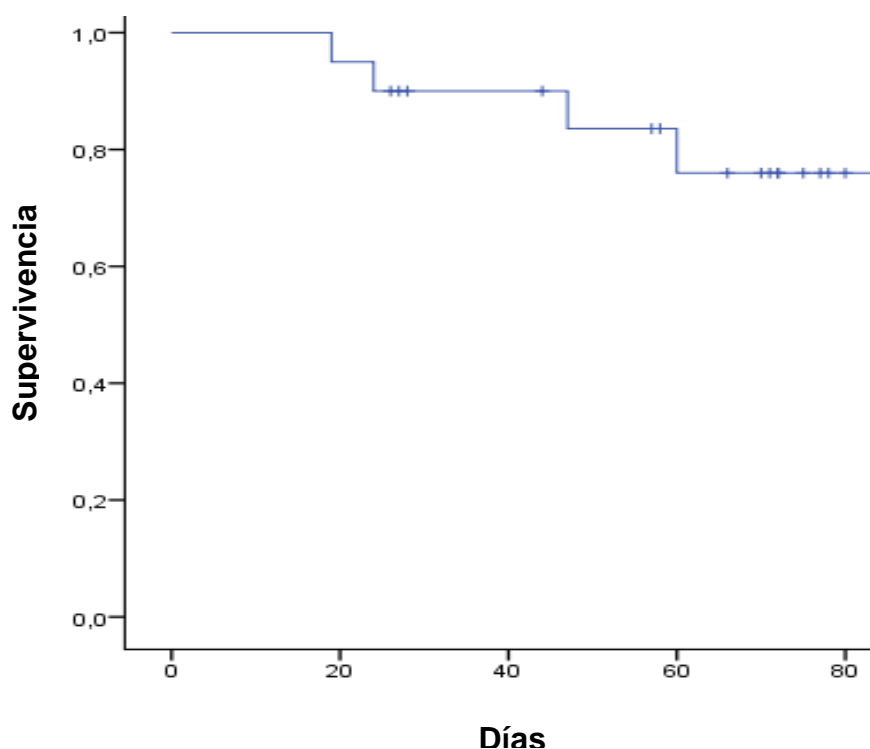


Figura 37: Supervivencia al finalizar los ensayos

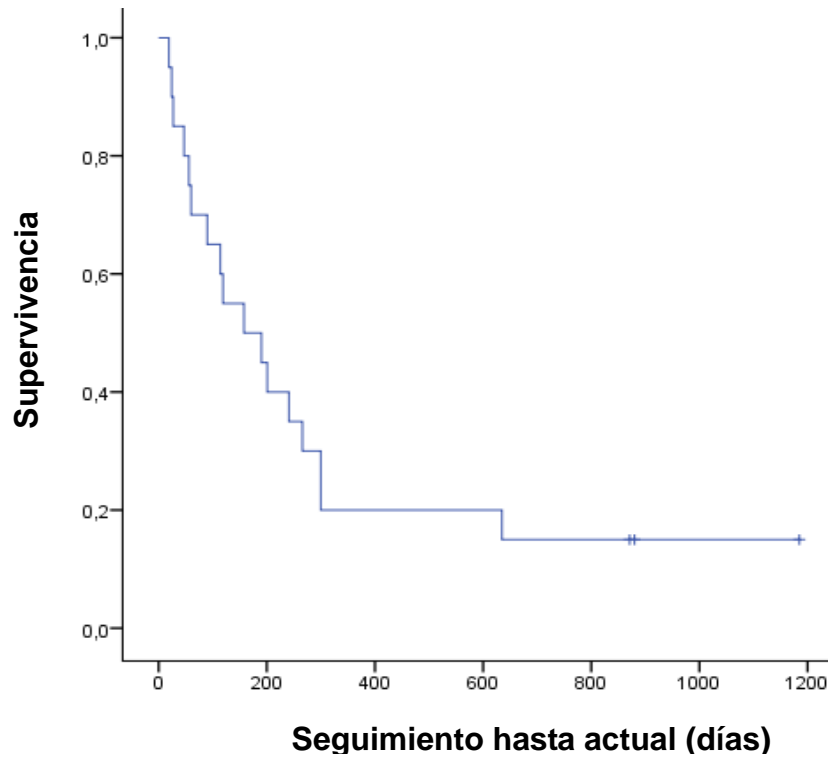


Figura 38: Supervivencia tras período de seguimiento

En la figura 39 se muestra la comparativa de las curvas de supervivencia de LLAT y Lydia al final de los ensayos. Mediante Log Rank test no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de ambos ensayos (p 0,88).

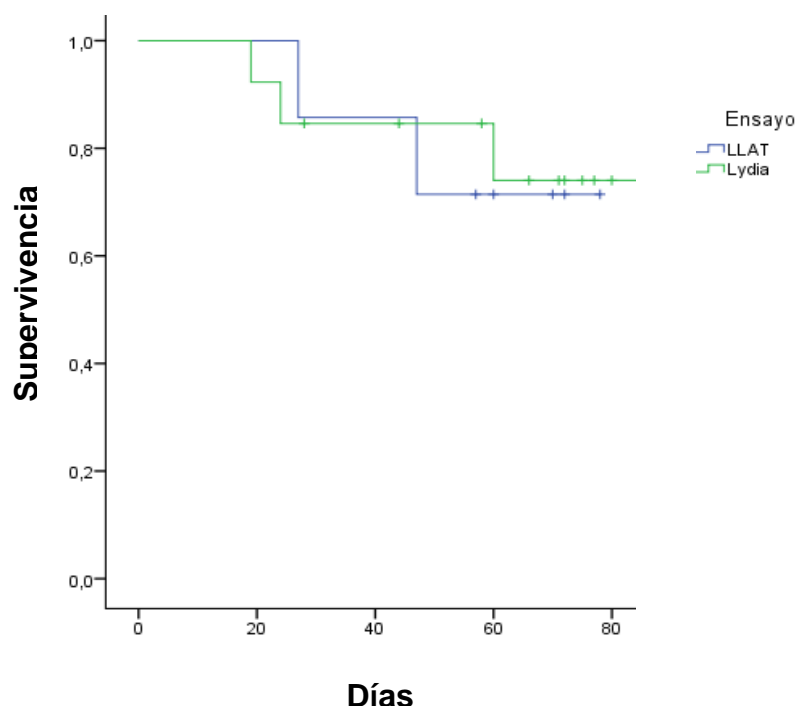


Figura 39: Comparativa de curvas de supervivencia de LLAT y Lydia al finalizar los ensayos

7.- RELACIÓN ENTRE NÚMERO DE CÉLULAS INFUNDIDAS Y RESPUESTA TUMORAL.

En LLAT y Lydia se intentó correlacionar la respuesta tumoral con la cantidad de células NKAЕ y LT infundidos. Los resultados se muestran en las figuras 40 y 41.

Se encontró correlación entre el número de NKAЕ y LT infundidos y la respuesta medular, observándose una mejor respuesta a mayor cantidad de NKAЕ y LT infundidos.

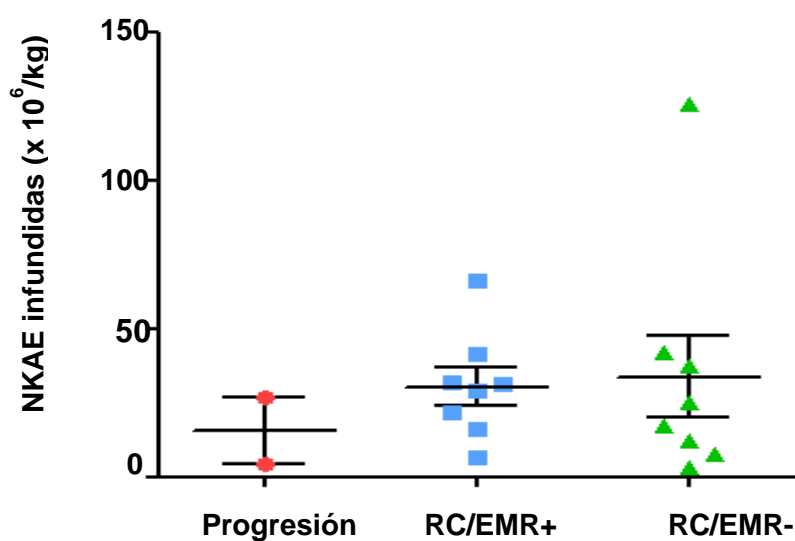


Figura 40: Relación entre número de NKAЕ infundidas y respuesta tumoral

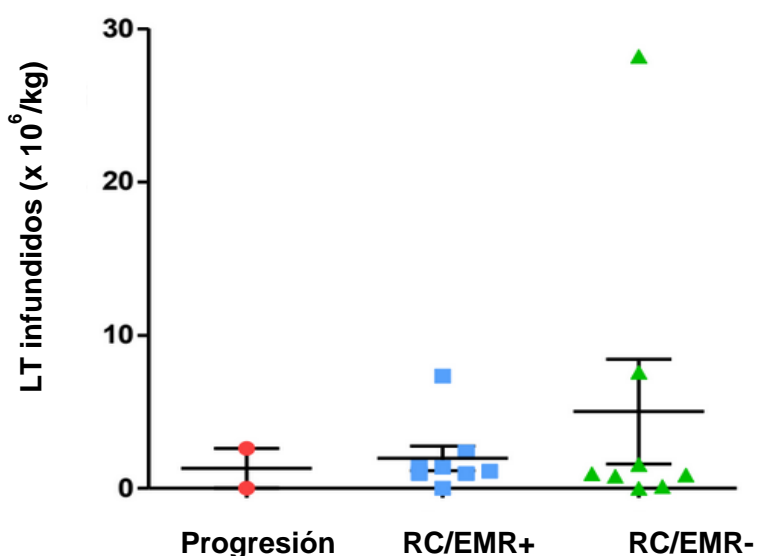


Figura 41: Relación entre número de LT infundidos y respuesta tumoral

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1.- USO DE CÉLULAS NK COMO INMUNOTERAPIA EN PACIENTES CON CÁNCER.

En este trabajo se describen dos protocolos distintos para la obtención de células NK estimuladas con IL-15 que se utilizaron con éxito en tres ensayos clínicos: 1) purgado de LT seguido de selección de NK por método inmunomagnético y estimulación *ex vivo* con IL-15 (NK-IL15) y 2) expansión y activación mediante cocultivo de células mononucleares con células K562-mb15-41BBL (NKAE).

Varios estudios ya han demostrado la seguridad y plausibilidad de la terapia con células NK en pacientes con cáncer. Esta terapia puede ser aplicada en diversas situaciones clínicas. Actualmente se están utilizando en numerosos ensayos con diversos tipos de tumores, especialmente hematológicos, pero también en tumores sólidos como melanomas y carcinomas.

También se ha utilizado en pacientes con alto riesgo de recaída tras TPH haploidéntico. Los resultados preliminares han sido satisfactorios en lo relacionado a la seguridad del tratamiento.

La experiencia en pacientes pediátricos es más limitada. El Dr. Rubnitz (Hospital de St. Jude, Memphis, EEUU) publicó un estudio en el año 2010¹¹ con 10 pacientes pediátricos con LMA en primera remisión completa, en los que se realizó infusión de células NK haploidénticas como terapia de consolidación. Se observó una supervivencia libre de eventos del 100% a los 2 años permaneciendo en remisión completa. Otros grupos como el del Dr. Koehl (Hannover Medical School, Hannover, Alemania) infundieron tras TPH haploidéntico células NK estimuladas con IL-2 a 3 pacientes pediátricos con leucemia refractaria con EMR positiva. No hubo toxicidad y se observó remisión y quimera completa al mes postTPH⁷⁶.

En 2015, Rubnitz e Inaba publicaron un nuevo estudio en el que habían infundido células NK haploidénticas a 29 pacientes pediátricos con leucemia refractaria o en recaída, asociado a quimioterapia (clofarabina, etopósido y ciclofosfamida), de forma similar a este trabajo⁷⁷. Se dividieron en 2 cohortes según si habían recibido previamente TPH o no. Se utilizó como método de producción la selección inmunomagnética con CliniMACS® infundiendo directamente el producto celular obtenido. Los pacientes recibieron IL-2 subcutánea desde el día previo a la infusión. En la cohorte sin TPH previo (n=14), se observó respuesta medular en 10 pacientes, 12 pacientes recibieron posteriormente un TPH y se consiguió una supervivencia libre de eventos del 36% (n=5). En la cohorte 2 (n=15), 10 pacientes presentaron respuesta

medular y recibieron un segundo TPH. Se consiguió una supervivencia libre de eventos del 27% (n=4). El tratamiento fue bien tolerado sin efectos adversos destacables.

2.- DISFUNCIÓN DE CÉLULAS NK EN PACIENTES CON CÁNCER Y SU REPERCUSIÓN EN SU USO COMO INMUNOTERAPIA. IMPORTANCIA DE LA DISPARIDAD KIR/HLA.

La terapia con células NK puede ser derivada de fuentes autólogas o alogénicas. Las células NK de pacientes con cáncer pueden tener defectos funcionales^{20,78}. Por el contrario, las células NK alogénicas de donantes sanos no HLA idénticos, como se propone en este trabajo, no sólo tienen una funcionalidad normal sino que mejoran el efecto injerto contra tumor por la disparidad KIR/HLA-I^{79,80} y por la vía activadora.

Previamente el grupo del Dr. Pérez-Martínez²⁰, demostró la disfunción de las células NK en pacientes pediátricos con diferentes tipos de tumores sólidos, en los que existe una inversión de las subpoblaciones de células NK con predominio de las células NK *bright*. Al carecer las NK *bright* de receptores KIR no son capaces de reconocer la ausencia de HLA clase I de las células tumorales, suponiendo esto un mecanismo de escape de los tumores. Se demostró que la estimulación con IL-15 revierte este estado de inmunotolerancia, mejorando la citotoxicidad *ex vivo* y disminuyendo la carga tumoral *in vivo*. En este hallazgo se basa el ensayo clínico con NK-IL15.

El grupo de Viel y Walzer⁸¹ (Universidad de Lyon, Francia) también estudió cómo la actividad de las células NK se encuentra disminuida en los pacientes con cáncer. Estos autores postulan que son mediadores producidos por el propio tumor los que regulan negativamente la actividad de las células NK, inhibiendo además su maduración.

Diferentes estudios han realizado la expansión *in vivo* de células NK autólogas mejorando su actividad antitumoral mediante la administración a los pacientes de citoquinas como la IL-2. Otras estrategias incluyen la expansión y activación *ex vivo* de células NK autólogas para después infundirlas a los pacientes en combinación con IL-2^{48,82}. Estas técnicas tienen peores resultados debido a que IL-2 no sólo produce expansión de las células NK sino también de los LT reguladores, los cuales inhiben las funciones de las células NK, por lo que a pesar de su expansión éstas no presentan actividad antitumoral máxima. Esta pérdida de eficacia puede deberse a la interacción de HLA clase I de las células tumorales con los receptores de las células NK autólogas, produciendo la inhibición de su función.

Recientemente, el grupo del Dr. Martínez López en el Hospital Doce de Octubre de Madrid, infundió células NK autólogas expandidas *ex vivo* en pacientes con mieloma múltiple refractario o en recaída utilizando el cocultivo con la línea celular K562-mb15-41BBL utilizado en LLAT y Lydia. Este grupo realizó la infusión del producto en combinación con quimioterapia, sin utilizar IL-2. Las infusiones fueron bien toleradas, sin efectos adversos destacables. Al no utilizar IL-2, los LT reguladores no se modificaron. Un paciente presentó respuesta parcial y 3 pacientes de un total de 5, estabilización de la enfermedad⁵⁰.

La terapia con células NK alogénicas parece ser superior a la terapia con células NK autólogas, al mejorar la eficacia antitumoral debido a su procedencia de donantes sanos. Además, esta actividad se puede optimizar aún más por la disparidad donante-receptor entre KIR del donante y HLA clase I del receptor. La disparidad KIR/HLA juega por tanto un papel fundamental en el efecto injerto frente a tumor. Varias publicaciones demuestran que los pacientes con LMA tienen menor riesgo de recaída cuando reciben un TPH con células NK alorreactivas. Del mismo modo ocurre con la infusión de células NK alogénicas fuera del contexto del TPH.

El conocimiento de los receptores KIR y su importancia en la función de las células NK han permitido que se mejoren los criterios para la selección de donantes. Esto supone un importante avance tanto en el TPH como en terapia celular. El Dr. Leung en el Hospital de St. Jude⁶ (Memphis, Estados Unidos), presentó en 2013 un método para optimizar las infusiones de células NK en niños con cáncer. El primer paso consiste en la selección del donante basada en tipaje KIR de alta resolución. Este método fue utilizado por el mismo grupo en infusiones de células NK para el tratamiento de leucemias refractarias, para consolidación tras TPH en pacientes de alto riesgo y en sustitución del TPH en pacientes de riesgo elevado que se encontraban en remisión^{83,84}.

Se ha realizado tipaje KIR para selección del donante en los ensayos que se presentan en este trabajo. En el caso de NK-IL15, sólo un donante presentaba disparidad KIR/HLA. Fue uno de los 3 pacientes que consiguió remisión parcial. En LLAT/Lydia 9 donantes (50%) presentaba esta disparidad. Sin embargo, no se han encontrado diferencias de supervivencia entre KIR idénticos y no idénticos. Una posible explicación sería que las células NK infundidas tienen un fenotipo extremadamente activado, con aumento en la expresión de los receptores activadores esenciales para el efecto citotóxico de las células NK (NKp30, NKp46, NKp44, DNAM-1 y NKG2D) siendo el receptor NKG2D el mayoritariamente expresado en ambos productos, por lo que la disparidad KIR presumiblemente no aumente más su capacidad citotóxica. Se sabe que la activación de las células NK tras la unión de los receptores activadores a sus respectivos ligandos en las células tumorales está supeditada a las señales de

inhibición recibida a través de los receptores KIR, excepto en el caso de NKG2D cuya unión a sus ligandos es capaz de superar las señales inhibitoras proporcionadas por los receptores KIR⁸⁴.

En resumen, el posible efecto terapéutico de la infusión de células NK de donante sanos en pacientes con tumores se basa en: 1) revertir la actividad citotóxica disminuida de las células NK en los pacientes al diagnóstico, debido a la enfermedad y durante el tratamiento, debido a la quimioterapia; 2) en la expresión en las células tumorales de ligandos para los receptores activadores de las células NK del donante; 3) la ausencia y/o diferencias de ligandos en las células tumorales para los receptores inhibitorios de las células NK del donante; 4) los mecanismos de inmunoevasión de las células tumorales que son abolidos por estrategias de activación NK.

3.- DIFERENTES ESTRATEGIAS DE EXPANSIÓN Y ACTIVACIÓN DE CÉLULAS NK PARA USO CLÍNICO.

El problema fundamental para el uso clínico de células NK es su bajo número en sangre periférica. Los procedimientos de aislamiento, expansión y activación de estas células son costosos y laboriosos, precisan personal entrenado y deben ser realizados bajo condiciones NCF.

Se han descrito diferentes protocolos para la producción NCF de células NK para uso clínico. Sin embargo, ningún procedimiento se ha establecido como estándar hasta la fecha.

Es difícil comparar los distintos protocolos de producción debido a la gran variabilidad de materiales, tecnologías y procesos de manufacturación utilizados.

Tanto en LLAT/Lydia como en el ensayo con NK-IL15, se ha utilizado como fuente células mononucleares obtenidas de sangre periférica o por aféresis, al igual que en la mayoría de protocolos publicados, minimizando el riesgo de contaminación del producto al utilizar sistemas cerrados. Otros grupos han utilizado otras fuentes como cordón umbilical o células pluripotenciales hematopoyéticas.

Además de la fuente, el método de expansión, las citoquinas utilizadas para la activación y el medio de cultivo tienen repercusión en la calidad y eficacia del producto final⁹.

En cuanto al medio de cultivo, en nuestros ensayos hemos utilizado el medio RPMI suplementado con suero humano AB al 10%. Los medios más utilizados en los ensayos publicados son X-VIVO sin suero (BioWhittaker, Verviers,

Bélgica), AIM V (Life Technologies, Nueva York), o medio de crecimiento de *stem cells* (SCGM; CellGenix, Friburgo, Alemania). Generalmente el medio se suplementa con suero humano AB. En cuanto a las condiciones ambientales, se han utilizado las condiciones estándar (37°C y 5% CO₂)^{9,42}.

Se han descrito protocolos basados en aislamiento de células NK por métodos inmunomagnéticos desde productos de aféresis, otros en métodos de expansión mediante estimulación con citoquinas o cocultivo con líneas celulares estimuladoras y otros combinando ambos métodos.

En este trabajo se ha utilizado selección inmunomagnética y cocultivo celular, consiguiendo un buen ratio de expansión celular y viabilidad tanto con el método NK-IL15 como NKAЕ.

Varios estudios han utilizado el sistema inmunomagnético CliniMACS® utilizando productos de leucoaféresis no movilizados de forma similar al ensayo con NKIL-15, obteniendo también buenos resultados, con una pureza elevada de células NK similar a la descrita en este trabajo. Con el método NKIL-15 se observa que con cada paso del procedimiento se produce una pérdida celular, principalmente con la estimulación con IL-15. El objetivo debe ser mejorar la técnica para evitarlo. Esto puede ser porque las células se quedan pegadas a las paredes de los frascos y son difíciles de recuperar. Habría que mejorar la técnica utilizando otros métodos NCF para optimizar la recuperación celular.

Por otro lado, los métodos de expansión mediante cocultivo se han mostrado más eficaces que la estimulación con citoquinas ya que estimulan la proliferación de células NK no solo mediante factores humorales sino también por contacto entre células. El uso de células NK activadas y expandidas mediante cocultivo con células presentadoras de antígeno derivadas de humanos es una alternativa emergente, que se han utilizado en los ensayos clínicos LLAT y Lydia^{48,50,85}. El grupo del Profesor Darío Campana (St. Jude, Memphis, EEUU) en 2009 describió que la línea celular K562-mb15-41BBL induce proliferación específica de células NK tanto en pacientes sanos como en pacientes con leucemia y desarrolló un banco de esta línea celular bajo condiciones NCF demostrando que es posible la producción a gran escala de estas células para uso clínico⁶⁸. Estudios preclínicos utilizando esta línea celular han aportado índices óptimos de expansión y aumento de expresión de receptores activadores respecto a otros métodos, aumentando la capacidad citotóxica de las células NK que presentan una actividad antitumoral evidente frente a líneas tumorales en modelos *in vivo* de leucemia aguda y tumores sólidos^{68,85,86}, también demostrada en los análisis *ex vivo* de LLAT y Lydia.

Comparando nuestros resultados con lo publicado por otros grupos utilizando la misma línea celular y el mismo medio de cultivo, se observa que los resultados

son similares en cuanto a viabilidad en el día +7 y en el porcentaje de LT en el día +14. Sin embargo, la pureza de células NK y el ratio de expansión en nuestros ensayos en el día +14 fue más bajo. Esto puede deberse a que se ha mantenido el medio de cultivo previo en lugar de renovarlo, por lo que los sustratos han podido ir agotándose. Comparando estos resultados con otros estudios que utilizan otro medio de cultivo (SCGM) se observa que la pureza de células NK y el ratio de expansión que se obtiene es bastante más bajo que lo publicado. Esto sugiere que quizás debería modificarse el medio de cultivo de RPMI a SCGM ya que éste parece ser más adecuado para el crecimiento de células NK.

Respecto a las citoquinas, la mayoría de protocolos publicados utilizan IL-2. Se ha intentado optimizar la expansión de células NK con la ayuda de otras citoquinas como la IL-15 mejorando la viabilidad y expansión del producto. Las citoquinas IL-2 e IL-15 tienen distintos efectos sobre las células NK. Por otro lado, las toxicidades de ambas citoquinas son distintas. Comparado con IL-2, IL-15 tiene menor riesgo de síndrome de fuga capilar. Estos datos sugieren que la IL-15 puede representar una buena candidata para uso en inmunoterapia, sin embargo, aunque puede tener ventajas, parece que la estimulación durante mucho tiempo con IL-15 podría tener efecto leucemógeno, por activación de la vía JAK/STAT, especialmente STAT3 y STAT5, por lo que debe ser usada con precaución⁸⁷. Recientemente, el grupo del Dr. Miller (Universidad de Minnesota, Minneapolis) ha publicado un trabajo⁴² en el que se administró IL-15 recombinante por vía subcutánea en dosis ascendentes a 19 pacientes adultos con tumores sólidos refractarios. La terapia fue bien tolerada excepto en 3 pacientes en los que se suspendió el tratamiento por efectos adversos (empeoramiento de psoriasis previa, pancreatitis y dolor torácico de origen cardíaco, respectivamente). En nuestros ensayos, la retiramos del medio previamente a la infusión a los pacientes porque no estaba disponible para uso clínico. Se comprobó que su uso *in vitro* incrementaba la expresión de receptores activadores mejorando la citotoxicidad del producto final.

Algunos estudios han realizado infusiones de células NK tras TPH haploidéntico. La principal diferencia con nuestro ensayo con NKIL-15 es que, en la mayoría de estudios previos, las células NK son estimuladas con IL-2. En este trabajo se ha utilizado IL-15 *ex vivo* ya que es un mejor factor de crecimiento fisiológico responsable de la diferenciación, supervivencia y actividad citotóxica de las células NK maduras y parece que mejoraría la reconstitución inmune tras TPH alogénico.

4.- COMPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS NKIL-15 Y NKAЕ.

Entre ambos productos se observaron dos diferencias importantes que hay que destacar: la primera es que el producto final es diferente en términos de pureza

de células NK. Con el producto NK-IL15 se consigue una alta pureza en células NK con resultados similares a los obtenidos por el grupo del Dr. Koehl⁷² (Hannover Medical School, Hannover, Alemania) usando el mismo protocolo en el CliniMACS®. Además, se añade la estimulación *ex vivo* con IL-15, tras lo que se obtiene un purgado total de LT y células NKT. Los productos NKAЕ sin embargo contienen LT y NKT residuales. La implicación de esto es que, en el contexto del TPH, debe utilizarse el procedimiento con mayor pureza de células NK con el objetivo de minimizar el riesgo de EICR. Por ello, NK-IL15 debería utilizarse en el contexto del TPH mientras que el producto NKAЕ podría no ser óptimo en este contexto.

La segunda diferencia entre los dos productos es el tiempo de producción. La producción de NK-IL15 es un método más rápido, mientras que el cultivo requiere un mínimo de 14-21 días, ya que precisa expansión celular. No obstante, ambos productos se obtienen en un tiempo razonable.

Una potencial desventaja del método NKAЕ es que el tiempo prolongado en cultivo puede reducir la expansión *in vivo* de las células tras la infusión a los pacientes, debido al acortamiento de telómeros por senescencia debido a la alta actividad replicativa y a la inestabilidad genómica producida por las altas dosis de IL-15^{71,88,89}. A pesar de que no se ha analizado en este trabajo la longitud de los telómeros, se ha comprobado estabilidad genética en todos los productos. Una forma de evitar este obstáculo podría ser el uso de la línea celular modificada K562-mbIL21-41BBL. El grupo del Dr. Zhu⁹⁰ (Universidad de Shanghai, China) en 2012 y Srinivas Somanchi y Dean Lee⁷⁰ (MD Anderson Cancer Center, Universidad de Texas, EEUU) en 2016 desarrollaron esta línea celular consiguiendo un alto porcentaje de expansión con aumento de expresión de receptores activadores y citotoxicidad aumentada respecto a las células NK basales, mientras se mantienen la longitud de los telómeros. Varios ensayos clínicos están en marcha para analizar la seguridad y eficacia de este método pero aún no hay resultados disponibles.

Por otro lado, el uso de líneas celulares modificadas genéticamente es controvertido por el riesgo potencial que las células residuales pueden tener en el paciente. Por ello, en LLAT y Lydia la línea K562-mbIL15-41BBL se irradió con 100 Gy para evitar proliferación y se demostró su ausencia en el control de calidad del producto final mediante RT-PCR.

En cuanto al fenotipo del producto final, ambos métodos incrementan la expresión de receptores activadores y de marcadores de activación incluyendo NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp44 y NKp46, cuando se comparan con las células NK basales. Comparando ambos métodos, NKAЕ presenta una mayor expresión de estos receptores, lo que se relaciona con mayor citotoxicidad. Por tanto, el producto con mayor funcionalidad es NKAЕ aunque ambos productos

son superiores a las NK basales. Estos datos coinciden con lo previamente publicado^{86,91}.

El grupo de Darío Campana comprobó que la interacción entre NKG2D y DNAM-1 con sus ligandos en las células tumorales, es esencial para la citotoxicidad *in vitro* de las células NK contra líneas celulares de sarcoma de Ewing y de leucemia aguda mieloide, ya que la interferencia con esas moléculas reduce significativamente la actividad de las células NK⁶⁸.

En el trabajo publicado por el grupo de Shah⁹¹ se observó que el bloqueo de los receptores activadores NKG2D, NKp44 y NKp46 disminuía la actividad citotóxica de las células NK.

También se observa una disminución de la expresión de los receptores inhibidores excepto de KIR2DS4 y NKG2A, con altos niveles de expresión de NKG2A en ambos productos (>80%).

Varios grupos han estudiado la posible repercusión de la expresión de NKG2A respecto a la citotoxicidad de las células NK. NKG2A puede abolir la respuesta de las células NK contra los tumores que expresan HLA-E, aun en el contexto de donante haploidéntico KIR/HLA clase I. La mayoría de células hematopoyéticas sanas y neoplásicas expresan HLA-E por lo que estarían protegidas de la citotoxicidad de las células NK^{12,91,92}.

El grupo del Dr. Wieten (Universidad de Maastrich, Países Bajos)⁹³ estudió la relevancia de las moléculas HLA clase I y HLA-E en la actividad de las células NK alogénicas frente a células de mieloma múltiple. Demostraron el potencial efecto inhibitor de estos HLA en la alorreactividad de las NK *in vitro*. Seleccionar un donante KIR/HLA clase I haploidéntico puede resolver en parte el problema pero la expresión de HLA-E puede ser uno de los mecanismos de escape de los tumores a la acción de las células NK. Para mejorar la respuesta estos autores postulan la utilización de células NK NKG2A negativas o bien el desarrollo de estrategias para inhibir la interacción NKG2A con HLA-E.

Nguyen y Godal (Universidad Sorbona, París, Francia)⁹⁴ ya demostraron *in vitro* que el tratamiento con anticuerpos anti-NKG2A es capaz de reconstituir la acción de las NK que expresan NKG2A contra las células leucémicas.

Más recientemente, el grupo de la Dra. Ruggeri (Peruggia, Italia) publicó un estudio en el que utilizaba anti-NKG2A humanizado *in vitro* e *in vivo* mejorando la citotoxicidad de las células NK que expresan NKG2A obtenidas de donantes idénticos o haploidénticos pudiendo representar una nueva arma terapéutica⁹⁵.

Las ventajas del método NKAЕ respecto a NK-IL15 son la posibilidad de infundir células NK en varios momentos durante la expansión, la mayor expresión de receptores activadores y su mayor citotoxicidad. Las desventajas son el tiempo necesario para la expansión, la contaminación por LT y la limitada proliferación potencial *in vivo* tras la infusión.

Las ventajas de NK-IL15 son la rapidez del procedimiento, la mayor pureza de células NK y la ausencia de LT además de la facilidad de combinación con otras terapias. Las desventajas son que sólo se pueden infundir en un único momento y la necesidad de expansión *in vivo* para ser activas.

5.- EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y EFECTIVIDAD EN EL USO CLÍNICO.

La terapia con células NK tiene un prometedor perfil de seguridad. Los ensayos publicados hasta el momento muestran que las infusiones de células NK son generalmente bien toleradas sin efectos adversos graves y no inducen EICR severo, al igual que lo observado en este trabajo^{72,67,34}.

Los ensayos LLAT/Lydia son los segundos en emplear NKAЕ obtenidas con la línea celular K562-mbIL15-41BBL en humanos. Sólo un ensayo previo publicado por el grupo de Shah (National Cancer Institute, Bethesda, EEUU)⁹¹ en 2015 estudió el efecto de las células NK expandidas de esta forma en niños y adultos jóvenes con tumores sólidos de alto riesgo tras TPH HLA idéntico con purgado de LT. Se observó en este caso el desarrollo de EICR agudo en 5 de los 9 pacientes infundidos, con grado IV en 3 de ellos. Fue más frecuente en TPH de donantes no emparentados. Cabe destacar que ningún paciente recibió profilaxis de EICR y el acondicionamiento fue no mieloablativo en todos ellos. A diferencia de lo descrito por este grupo, en LLAT/Lydia no se ha observado EICR en ninguno de los pacientes estudiados, a pesar de la infusión de más de 11×10^6 LT/kg, siendo la terapia bien tolerada, sin efectos adversos graves. Sólo se ha registrado un caso de reactivación de EICR tras el primer ciclo de LLAT. El paciente había recibido previamente un TPH no emparentado no idéntico y se encontraba en situación de recaída con EICR. La posible explicación es que la terapia combinada de quimioterapia e infusiones de NKAЕ descendió la carga leucémica reestableciendo el quimerismo completo por lo que se reactivó el EICR previo.

Se debe tener en cuenta que LLAT/Lydia están fuera del contexto del TPH, lo cual puede tener un efecto protector frente al EICR por la expansión de poblaciones reguladoras^{95,96}. Estos resultados indican que la terapia con NKAЕ es bien tolerada fuera del contexto del TPH.

En el ensayo NK-IL15, 3 de los 6 pacientes incluidos desarrollaron EICR > grado II previo a la infusión, sin observarse modificación del grado de EICR tras

la misma. Es razonable pensar que los injertos de donantes haploidénticos y la enfermedad progresiva favorece el desarrollo de EICR pese a que la cantidad de LT en el injerto del TPH fue $<15 \times 10^3/\text{kg}$ en todos los casos^{97,98}.

En cuanto a las reacciones derivadas de la infusión, la única reacción adversa registrada en LLAT/Lydia fueron reacciones febriles, al igual que lo descrito en la literatura^{9,34}. Se registró únicamente en 4 pacientes. En el caso de NK-IL15 no se registraron efectos adversos atribuibles a la infusión.

En el estudio del grupo de Rubnitz¹¹, los pacientes toleraron todas las dosis de ciclofosfamida, fludarabina e IL-2 y presentaron toxicidad no hematológica leve: un paciente presentó edema y eritema de la zona de inyección de la IL-2, un paciente presentó una infección respiratoria viral, y otro paciente precisó ingreso durante 2 días por neutropenia febril. Estos efectos adversos son similares a los observados en nuestros ensayos.

La toxicidad registrada en los ensayos fue secundaria al tratamiento quimioterápico previo a la infusión. En LLAT/Lydia principalmente se registró neutropenia febril, bacteriemia y neutropenia severa. Se observó que la toxicidad fue significativamente mayor en los pacientes que recibían quimioterapia de alta intensidad. Los pacientes de NK-IL15 presentaron en relación con el TPH, infecciones, neutropenia febril, pancitopenia severa, cistitis hemorrágica y microangiopatía trombótica, que no se relacionaron con las infusiones.

La combinación clofarabina-etopósido-ciclofosfamida presentó la mayor tasa de toxicidad. Ensayos previos que utilizaban esta combinación para el tratamiento de leucemia/linfoma en recaída/refractario ya describieron como efectos adversos frecuentes neutropenia febril y alta tasa de infecciones^{99,100}. El grupo de Hijiya (Hospital de Chicago, EEUU)¹⁰⁰ en un estudio con una cohorte de 25 pacientes con LLA refractaria o en recaída, describió 7 casos de muerte relacionada con este protocolo quimioterápico: enfermedad veno-oclusiva (2), shock séptico (2), insuficiencia renal aguda (1), edema pulmonar (1), e infección fúngica pulmonar (1). En este estudio, la supervivencia tras 217 días fue del 24%.

Por tanto, el balance entre eficacia y toxicidad aceptable de acuerdo a nuestros datos pueden ser los regímenes FLAG-Ilda o AraG/VP/Cy. Los efectos adversos observados en estos pacientes incluyen neutropenia febril, mucositis, infección y neurotoxicidad relacionada con nelarabina, correspondiendo en frecuencia y severidad a lo previamente publicado en la literatura^{77,101}.

El grupo de Tavit (Ankara, Turquía), en un estudio con una cohorte de 25 pacientes con LMA/LLA de mal pronóstico tratados con Flag-Ilda encontró una

supervivencia del 20% (1200 días)^{102,25}. El grupo de Commander (Hospital de Philadelphia, EEUU), en un estudio con 7 pacientes con LLA-T/linfoma refractarios o en recaída tratados con Ara-G/VP/Cy describieron una supervivencia del 14% (450 días)^{73,101}.

Por otro lado, las dosis utilizadas en las infusiones no están bien establecidas, varían en los distintos ensayos publicados.

Las dosis máximas de NKAe e IL-2 utilizadas en LLAT/Lydia se basaron en el estudio previo del grupo de Rubnitz (Hospital de St. Jude, Memphis, EEUU) publicado en 2010¹¹ con pacientes pediátricos. En él se administró como tratamiento de consolidación un ciclo de Flu/Cy y posteriormente infusión de células NK con una mediana de 29×10^6 células NK haploidénticas/kg y 6 dosis de IL-2 (1×10^6 U/m²).

La dosis máxima tolerada de LT infundidos fue de $0,8 \times 10^6$ /kg en LLAT y de $7,05 \times 10^6$ /kg en LYDIA. El grupo de Rujkijyanont (Hospital de St. Jude, Memphis, EEUU)⁸⁸ publicó un estudio con 38 pacientes pediátricos con patología maligna hematológica que previamente habían recibido TPH alogénico y que presentaban quimerismo mixto recibieron infusiones de linfocitos de donante con dosis ascendentes en un intento de minimizar el riesgo de recaída. La dosis inicial se basó en el riesgo asociado de EICR según el tipo de TPH del paciente (haploidéntico>no emparentado>emparentado idéntico). Así, se utilizó una dosis inicial de $2,5 \times 10^4$, 1×10^6 y 1×10^7 respectivamente. Se incrementó 2 veces la dosis si no se observaba EICR. Solo 13,2% de los pacientes desarrollaron EICR agudo III/IV sin mortalidad asociada. En nuestra experiencia, fuera del contexto del TPH, no observamos casos de EICR, a pesar de la infusión de más de 11×10^6 LT/kg.

Respecto al número de infusiones, en el ensayo LLAT el esquema terapéutico incluye una única infusión con un elevado número de células NK. En LYDIA se infundió un producto NKAe adicional, pero el conteo de NKAe disponible para cada infusión fue menor de lo esperado. Con ésta pequeña cohorte no podemos concluir qué esquema terapéutico es mejor.

En NK-IL15 la infusión se realiza en el día +30 tras un TPH haploidéntico, con la intención de mejorar la recuperación de células NK. En este momento las NK son las células predominantes dentro de la población de linfocitos por lo que con la infusión las reforzamos para mejorar su número y citotoxicidad antitumoral. Sin embargo, no está claro el momento óptimo para la infusión. Algunos grupos proponen el día +7 sugiriendo que la infusión precoz mejoraría el injerto y podría prevenir el desarrollo de EICR. En nuestros pacientes no encontramos problemas en el injerto pero la infusión más temprana de células NK quizá podría haber reducido el desarrollo de EICR¹⁰².

Aunque no era el objetivo principal de nuestros ensayos, realizamos una revisión de la respuesta encontrando un efecto terapéutico positivo, previamente descrito en otros ensayos publicados^{9,34}.

Los grupos del Dr. Miller en 2005⁵² y del Dr. Rubnitz en 2010¹¹ encontraron respuestas positivas a la infusión de células NK haploidénticas en pacientes con LMA. Aun en casos sin respuesta tumoral significativa, la citometría de flujo y las técnicas moleculares mostraron que la mayoría de los pacientes presentan algún nivel de actividad NK atribuible a la infusión de estos productos.

El papel de la terapia con células NK respecto a la quimioterapia adyuvante es otro de los aspectos que precisan más estudios.

Además, la respuesta observada es corta en el tiempo, por lo que consideramos este tratamiento como terapia puente al TPH^{103,104}. Por ello, todos los supervivientes vivos de nuestros ensayos LLAT/Lydia, recibieron TPH tras el mismo.

Se evaluaron datos biológicos como el número de NKAЕ infundidas y su inmunofenotipo para intentar correlacionar esos datos con el pronóstico de los pacientes. Aunque no es estadísticamente significativo, debido al tamaño de la muestra, se observó una correlación entre el número de NKAЕ infundidas y la remisión completa. También observamos una correlación entre el número de LT infundidos y mejor respuesta debido al conocido efecto injerto frente a leucemia de los LT. No se encontró correlación entre los picos de quimerismo y la respuesta tumoral, quizás debido al tamaño muestral.

En nuestro ensayo con NK-IL15, los resultados preliminares son alentadores si bien la muestra es pequeña. Observamos respuesta clínica en 4 de los 6 pacientes incluidos, con mejoría de las lesiones pulmonares en 2 pacientes. En el paciente 2 se observó disminución del tamaño de las metástasis pulmonares tras la segunda infusión, sin recibir quimioterapia adicional, lo que sugiere que las células NK pueden tener predilección por quedarse atrapadas en los pulmones¹⁰⁵.

Sin embargo, no se objetivó mejoría en el paciente 1 tras la segunda infusión, lo que sugiere que la respuesta inicial puede ser resultado de la combinación del régimen de acondicionamiento y la infusión.

Por lo tanto, el beneficio clínico de infusiones adicionales podría restringirse a reducir la extensión de las metástasis pulmonares. Pacientes seleccionados con pequeña carga tumoral y buen estatus clínico podrían beneficiarse de la

terapia con células NK alorreactivas para mejorar el efecto antitumoral tras TPH haploidéntico.

El mecanismo de respuesta podría ser la interacción entre ligandos de las células tumorales con receptores activadores en los pacientes 1, 2 y 3 y puede estar relacionado con la disparidad KIR/HLA-clase I en el paciente 6^{106,107}. Sin embargo, en el paciente 4 no se observó respuesta. Este paciente presentaba identidad HLA-I/KIR.

El estadio avanzado de la enfermedad y los efectos del TPH haploidéntico pueden limitar la eficacia de esta terapia.

6.- LIMITACIONES DEL TRABAJO.

Aunque los resultados de LLAT/Lydia son prometedores en cuanto a seguridad y respuesta, el estudio está limitado por una muestra relativamente pequeña de pacientes además de gran variabilidad en sus características (enfermedad de base, tratamientos previos recibidos, características de los donantes...). Se han utilizado diferentes esquemas de quimioterapia coadyuvante, todos ellos intensivos, por lo que es difícil determinar la contribución de las infusiones de células NK en la respuesta. Se debe destacar que todos los pacientes que recibieron TPH tras el ensayo habían recibido quimioterapia de rescate de alta intensidad (Flag-Ida, AraG/VP/Cy o CLOVE) mientras que en ninguno de los que recibieron Flu/Cy se pudo realizar TPH.

Por otro lado, no en todos los pacientes se pudo realizar estudio de quimerismo y sólo en un caso fue posible constatar el quimerismo de células NK. Aunque lo esperable es que la mayoría de células detectadas correspondan a células NK ya que se infundieron una mediana de 85,36% de NKAЕ, se debe tener en cuenta que también pueden corresponder a LT o a otro tipo de células. Por ello, no se pudo establecer correlación entre el pico de quimerismo alcanzado y la respuesta observada.

En cuanto al ensayo con NK-IL15, las principales limitaciones son el pequeño número de pacientes incluido, la variabilidad de su patología de base, y que el TPH haploidéntico no es un tratamiento estándar para los tumores sólidos en progresión en la infancia.

7.- PERSPECTIVAS FUTURAS.

Los resultados de este estudio junto con lo publicado hasta el momento por otros grupos son esperanzadores, sobre todo lo relacionado con los parámetros de seguridad. Sirven de base para futuras investigaciones.

Son necesarios futuros estudios para determinar la contribución de las células NK a la respuesta tumoral además de para determinar el esquema terapéutico más adecuado según la patología a tratar y el método más óptimo de expansión de células NK, así como la dosis y número de infusiones necesarias en los pacientes y el momento más óptimo para su administración.

En el momento actual existe una gran disociación entre los tratamientos convencionales con los nuevos tratamientos inmunológicos y celulares, de manera que se reserva la utilización de la terapia celular en estadios de enfermedad muy avanzada. Se propone que la inmunoterapia celular sea una estrategia terapéutica en combinación con los tratamientos convencionales para mejorar el pronóstico de los pacientes. Incorporar el tratamiento con células NK constituye una nueva y exitosa arma terapéutica.

Los resultados de este estudio muestran que los métodos de producción NK-IL15 y NKAIE son plausibles y producen grandes cantidades de células NK activadas con capacidad citotóxica para uso clínico.

Mediante el avance en el conocimiento de los mecanismos de citotoxicidad de las células NK contra células tumorales y la optimización de los mecanismos de producción y expansión para su uso clínico se podrá seleccionar el producto óptimo para cada indicación. La mejoría de las estrategias para elección del donante basadas en tipaje KIR, la optimización de los protocolos para producción a gran escala de células NK para uso clínico y la armonización de los controles de calidad de los productos representan la base para futuros estudios. Además, el establecimiento de protocolos automatizados mejorará el coste-efectividad de la producción de células NK para uso clínico. Queda pendiente establecer, además de las dosis y el número de infusiones necesarias, los tipos de tumores en los que considerar esta terapia, ya que hay tumores que responderán mejor que otros.

En futuros estudios sería interesante intentar la caracterización y expansión separada de los subtipos de NK para infundir mayor cantidad de NK *dim* o subpoblaciones de células alorreactivas o con fenotipo memoria.

Por otro lado, se están llevando a cabo investigaciones para conocer los mecanismos de escape de las células tumorales y desarrollar células NK modificadas genéticamente para redirigirlas específicamente contra ciertas células tumorales como la expresión de CARs frente a antígenos tumorales o bien el uso de anticuerpos biespecíficos o trispecíficos (BiKEs o TriKEs) que unen las células NK a las células tumorales para aumentar la citotoxicidad tanto *ex vivo* como *in vivo*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) Los métodos de producción de células NK para uso clínico descritos en este trabajo son factibles y permiten obtener una elevada cantidad de células NK activadas. La producción de NK-IL15 es más rápida que la de NKAЕ y presenta mayor pureza de células NK y menor contaminación de LT.
- 2) Las características morfológicas y funcionales de ambos productos finales son diferentes. Ambos productos presentan una mayor expresión de receptores activadores que las células NK basales presentando un mayor porcentaje de expresión de CD69, CD25, NKp44, NKp46, NKp30, NKG2D y DNAM-1, lo que se relaciona con mayor citotoxicidad antitumoral *in vitro*. El producto NKAЕ es superior a NK-IL15 en cuanto a expresión de receptores activadores y, por tanto, en cuanto a citotoxicidad, presentando un mayor porcentaje de expresión de CD69, CD25, NKp46 y NKG2D.
- 3) Estos productos se utilizaron en tres ensayos clínicos, demostrando que su infusión a pacientes pediátricos es segura, sin registrarse reacciones adversas severas ni EICR relacionadas con la terapia celular. La escasa presencia de LT en el producto NK-IL15 supone una ventaja en su utilización en el contexto del TPH alogénico respecto a NKAЕ. La respuesta clínica observada en los pacientes es importante pero corta en el tiempo, por lo que la terapia celular con NK podría ser un tratamiento puente para otras estrategias de consolidación, como el TPH, con el objetivo de eliminar las células tumorales resistentes a la quimioterapia, responsables de la recaída o refractariedad, o en estrategias de consolidación con enfermedad mínima residual.
- 4) Se ha observado una correlación positiva entre el número de células NKAЕ y de LT infundidos y la respuesta tumoral, existiendo una tendencia a mejor respuesta en los pacientes que han recibido mayor cantidad de células NKAЕ y mayor cantidad de LT.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ward E., DeSantis C., Robbins A., Kohler B., Jemal A. (2014). Childhood and adolescent cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 64(2):83-103.
- 2) Pui CH., Yang JJ., Hunger SP., et al. (2015). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol.* 33(27):2938-48.
- 3) Cheng M., Chen Y., Xiao W., et al. (2013). NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cellular and Molecular Immunology.* 10 (3):230-52.
- 4) Cudkovicz G., Stimpfling JH. (1964). Hybrid resistance to parental marrow grafts: association with the K region of H-2. *Science.* 144 (3624):1339-40.
- 5) Herberman RB., Nunn ME., Lavrin DH. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer.* 16 (2):216-29.
- 6) Leung W. (2014). Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 20 (13):3390-99.
- 7) Karre K., Ljunggren HG., Piontek G., Kiessling R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* 319 (6055): 675-78.
- 8) Miller JS. (2013). Therapeutic applications: natural killer cells in the clinic. *Hematology.* 247-53.
- 9) Koepsell S., Miller J., McKenna D. (2013). Natural Killer cells: a review of manufacturing and clinical utility. *Transfusion.* 53 (2):404-10.
- 10) Ruggeri L., Capanni M., Urbani E., et al. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 295 (5562):2097-100.
- 11) Rubnitz JE., Inaba H., Ribeiro RC., et al. (2010). NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 28 (6):955-9.
- 12) Cooley S., Parham P., Miller J. (2018). Strategies to activate NK cells to prevent relapse and induce remission following HCT. *Blood Journal.* 131(10).1053-62.
- 13) Cho D., Shook DR., Shimasaki N., et al. (2010). Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin Cancer Res.* 16 (15):3901-9.
- 14) Colonna M. (2008). NK cells: New issues and challenges. *European Journal of Immunology.* 38 (11):2927-9.
- 15) Chan C., Andrews D., Smyth N. (2008). Can NK cells be a therapeutic target in human cancer? *European Journal of Immunology.* 38 (11):2964-8.
- 16) Di Santo JP. (2006). Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol.* 24:257-86.
- 17) Gregoire C., Chasson I., Luci C., et al. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev.* 220:169-82.
- 18) Pittari G., Fregni G., Roguet L., et al. (2010). Early evaluation of natural killer activity in post-transplant acute myeloid leukemia patients. *Bone Marrow Transplant.* 45 (5):862-71.

- 19) Godfrey J., Benson DM. (2012). The role of natural killer cells in immunity against multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 53 (9):1666-76.
- 20) Quiroga V., Fernández L., Génesis I., Núñez F., Pérez-Martínez A. (2012). Kill the killers: terapia con células Natural Killer en pacientes pediátricos con cáncer refractario. *Sanid.mil*. 68(3):141-6.
- 21) Cheent K., Khakoo SI. (2009). Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology*. 126 (4):449-57.
- 22) Schlums H., Cichocki F., Tesi B., et al. (2015). Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*. 42 (3):443-56.
- 23) Schultz-Cherry, S. (2015). Role of NK cells in influenza infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 386:109-20.
- 24) Ornstein BW., Hill EB., Geurs T., French A. (2013). Natural killer cell functional defects in pediatric patients with severe and recurrent herpesvirus infections. *J Infect Dis*. 207 (3):458-68.
- 25) Sungur CM., Murphy WJ. (2014). Positive and negative regulation by NK cells in cancer. *Crit Rev Oncog*. 19(1-2):57-66.
- 26) Ishigami S., Natsugoe S., Tokuda K., et al. (2000). Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Lett*. 159 (1):103-8.
- 27) Sconocchia G., Zlobec I., Lugli A., et al. (2011). Tumor infiltration by FcγRIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer*. 128 (11):2663-72.
- 28) Villegas F., Coca S., Villarrubia V. (2002). Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*. 35(1):23-8.
- 29) Ljunggren H., Karre K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 11 (7):237-44.
- 30) Cheng M., Chen Y., Xiao W. (2013). Cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol*. 10 (3):230-52.
- 31) Chouaib S., Pittari G., Nanbakhsh A., et al. (2014). Improving the outcome of leukemia by natural killer cell-based immunotherapeutic strategies. *Frontiers in Immunology*. 5:95.
- 32) Farag S., Fehniger T., Ruggeri L., et al. (2002). Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 100 (6): 1935-47.
- 33) Cooley S., Weisdorf DJ., Guethlein LA., et al. (2010). Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 116 (14):2411-9.
- 34) Koehl U., Kalberer C., Spanholtz J., et al. (2016). Advances in clinical NK cell studies: Donor selection, manufacturing and quality control. *Oncoimmunology*. 5 (4):1115-78.

- 35) Moretta L., Locatelli F., Pende D., et al. (2009). Natural Killer alloeffector responses in haploidentical hemopoietic stem cell transplantation to treat high-risk leukemias. *Tissue Antigens*. 75 (2):103-9.
- 36) Morgan DA., Ruscetti FW., Gallo R. (1976). Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*.193 (4257):1007–8.
- 37) Liao W., Lin J., Leonard W. (2013). Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity*. 38(1):13–25.
- 38) Steel J., Waldmann T., Morris J. (2012). Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 33(1):35–41.
- 39) Castillo E., Schluns K. (2012). Regulating the Immune system via IL-15 Transpresentation. *Cytokine*. 59(3):479–90.
- 40) Yu P., Steel JC., Zhang M., Morris JC., Waldmann TA. (2010). Simultaneous blockade of multiple immune system inhibitory checkpoints enhances antitumor activity mediated by interleukin-15 in a murine metastatic colon carcinoma model. *Clin Cancer Res*. 16(24):6019–28.
- 41) Steel JC., Ramlogan CA., Yu P., et al. (2010). Interleukin-15 and its receptor augment dendritic cell vaccination against the neu oncogene through the induction of antibodies partially independent of CD4 help. *Cancer Res*. 70(3):1072–81.
- 42) Miller J., Morishima C., McNeel D. (2017). A First-in-Human Phase 1 Study of Subcutaneous Outpatient Recombinant Human IL-15 (rhIL-15) in Adults with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 24(7):1525-35.
- 43) Rosenstein M., Yron Y., Kaufmann Y., Rosenberg SA. (1984). Lymphokine activated killer cells: Lysis of fresh syngeneic NK-resistant murine tumor cells by lymphocytes cultured in interleukin-2. *Cancer Res*. 44 (5):1946-53.
- 44) Grimm EA., Rosenberg SA. (1983). The human lymphokine-activated killer cell phenomenon. *Lymphokines*. 9:279.
- 45) Rosenberg S., Muli J., Spiess PJ., et al. (1985). Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J. Exp. Med*. 161:1169-88.
- 46) Yoon S., Kim t., Choi I. (2015). Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy. *Experimental & Molecular Medicine*. 47:141.
- 47) Vey N., Bourhis JH., Boissel N., et al. (2012). A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. *Blood*. 120(22):4317-23.
- 48) Ishikawa E., Tsuboi K., Saijo K., et al. (2004). Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res*.24 (3):1861-71.
- 49) Parkhurst MR., Riley JP., Dudley ME., Rosenberg SA. (2011). Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res*. 17(19):6287-97.
- 50) Leivas A., Pérez-Martínez A., Blanchard MJ., et al. (2016). Novel treatment strategy with autologous activated and expanded NK cells plus anti-myeloma drugs for multiple myeloma. *Oncoimmunology*. 5 (12):1250-1.

- 51) Kim PS., Kwilas AR., Xu W., et al. (2016). IL-15 superagonist/IL-15R α Sushi-Fc fusion complex (IL-15SA/IL-15R α Su-Fc; ALT-803) markedly enhances specific subpopulations of NK and memory CD8⁺ T cells, and mediates potent anti-tumor activity against murine breast and colon carcinomas. *Oncotarget*. 7(13):16130-45.
- 52) Miller JS., Soignier Y., Panoskaltsis-Mortari A., et al. (2005). Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 105 (8):3051-7.
- 53) Shi J., Tricot G., Szmania S., et al. (2008). Infusion of haploidentical killer immunoglobulin-like receptor ligand mismatched NK cells for relapsed myeloma in the setting of autologous stem cell transplantation. *Br. J. Haematol*. 143 (5):641-53.
- 54) Bachanova V., Cooley S., Defor TE., et al. (2014). Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. *Blood*. 123 (25):3855-63.
- 55) Eguizabal C., Zenarruzabeitia O., Monge J., et al. (2014). Natural Killer cells for cancer immunotherapy: pluripotent stem cells-derived NK cells as an immunotherapy perspective. *Frontiers in Immunology*. 5 (439):1-10.
- 56) Arai S., Meagher R., Swearingen M. (2008). Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy*. 10(6):625-32.
- 57) Williams BA., Law AD., Routy B., et al. (2017). A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy. *Oncotarget*. 8(51):89256-68.
- 58) Davis ZB., Vallera DA., Miller JS., Felices M. (2017). Natural killer cells unleashed: Checkpoint receptor blockade and BiKE/TriKE utilization in NK-mediated anti-tumor immunotherapy. *Semin Immunol*. 31:64-75.
- 59) Tay SS., Carol H., Biro M. (2016). TriKEs and BiKEs join CARs on the cancer immunotherapy highway. *Hum Vaccin Immunother*. 12(11):2790-96.
- 60) Felices M., Lenvik TR., Davis ZB., Miller J., Vallera DA. (2016). Generation of BiKEs and TriKEs to Improve NK Cell-Mediated Targeting of Tumor Cells *Methods Mol Biol*. 1441:333-46.
- 61) Gleason MK., Verneris MR., Todhunter DA., et al. (2012). Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production. *Mol Cancer Ther*. 11(12):2674-84.
- 62) Wei G., Hu Y., Pu C., et al. (2018). CD19 targeted CAR-T therapy versus chemotherapy in re-induction treatment of refractory/relapsed acute lymphoblastic leukemia: results of a case-controlled study. *Ann Hematol*. 97(5):781-9.
- 63) Maude SL., Frey N., Shaw PA., et al. (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 371(16):1507-17.

- 64) Spanholtz J., Preijers F., Tordoir M., et al. (2011). Clinical-grade generation of active NK cells from cord blood hematopoietic progenitor cells for immunotherapy using a closed-system culture process. *PloS One*. 6(6): e20740.
- 65) Granzin M., Soltenborn S., Muller S., et al. (2015). Fully automated expansion and activation of clinical-grade natural killer cells for adoptive immunotherapy. *Cytotherapy*. 17:621-32.
- 66) Lim O., Lee Y., Chung H., et al. (2013). GMP-compliant, large-scale expanded allogeneic natural killer cells have potent cytolytic activity against cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *PloS One*. 8 (1):53611.
- 67) Koehl U., Esser R., Uharek L., et al. (2013). Clinical-grade purification and expansion of CD56+CD3- NK cells for adoptive immunotherapy of solid tumors and leukemia. *www.miltenyibiotec.com*.15 (2):25-8.
- 68) Fujisaki H., Kakuda H., Shimasaki N., et al. (2009). Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res*. 69 (9): 4010-17.
- 69) Lapteva N., Szmania S., Rhee F., Rooney C. (2014). Clinical grade purification and expansion of natural killer cells. *Crit Rev Oncol*. 19 (1-2):121-32.
- 70) Somanchi S., Lee D. (2016). *Ex Vivo* Expansion of Human NK Cells Using K562 Engineered to Express Membrane Bound IL21. *Methods Mol Biol*.1441:175-93.
- 71) Sharma G., Gupta A., Wang H., et al. (2003). hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene*.22 (1): 131–46.
- 72) Koelh U., Brehm C., Huenecke S., et al. (2013). Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front Oncol*.3 (118):1-12.
- 73) Commander LA., Seif AE, Insogna IG., Rheingold SR. (2010). Salvage therapy with nelarabine, etoposide, and cyclophosphamide in relapsed/refractory paediatric T-cell lymphoblastic leukaemia and lymphoma. *Br J Haematol*.150 (3):345-51.
- 74) Kreyenberg H., Holle W., Mohrle S., et al. (2003). Quantitative analysis of chimerism after allogenic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Tuebingen experience. *Leukemia*. 17 (1):237-40.
- 75) Bader P., Niemeyer C., Willasch A., et al. (2005). Children with myelodysplastic syndrome and increasing mixed chimerism after allogenic stem cell transplantation have a poor outcome which can be improved by pre-emptive immunotherapy. *Br J Haematol*.128 (5):649-58.
- 76) Koehl U., Sorensen J., Esser R., et al. (2004). IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis*.33 (3):261-6.
- 77) Rubnitz J., Inaba H., Kang G., et al. (2015). Natural Killer cells therapy in children with relapsed leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 62(8):1468-72.

- 78) Terme M., Ullrich E., Delahaye NF., Chaput N., Zitvogel L. (2008). Natural killer cell directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat. Immunol.* 9 (5):486-94.
- 79) Lim O., Jung MY., Hwang YK., Shin EC. (2015). Present and future of allogeneic natural killer cell therapy. *Front. Immunol.* 6:286.
- 80) Handgretinger R., Lang P., Andre MC. (2016). Exploitation of natural killer cells for the treatment of acute leukemia. *Blood.* 127 (26):3341-49.
- 81) Viel S., Charrier E., Marçais A., et al.(2013). Monitoring NK cell activity in patients with hematological malignancies. *Oncoimmunology.*2 (9):e26011.
- 82) Alici E., Sutlu T., Bjorkstrand B., et al. (2008). Autologous antitumor activity by NK cells expanded from myeloma patients using GMP-compliant components.*Blood.*111 (6):3155-62.
- 83) Leung W. (2011). Use of NK cell activity in cure by transplant. *Br J Haematol.*155 (1):14-29.
- 84) Leung W., Lyengar R., Turner V., et al. (2004). Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol.* 172(1):644-50.
- 85) Cho D., Shook DR., Shimasaki N., et al. (2010). Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin Cancer Res.* 16 (15): 3901-09.
- 86) Szmania S., Lapteva N., Garg T., et al. (2015). *Ex vivo*-expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation *in vivo* in high-risk relapsed multiple myeloma patients. *JImmunother.*38 (1):24-36.
- 87) Mishra A., Sullivan L., Caligiuri MA. (2014). Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer. *Clin Cancer Res.* 20(8):2044-50.
- 88) Rujkijyanont P., Morris C., Kang G., et al. (2013). Risk-adapted donor lymphocyte infusion based on chimerism and donor source in pediatric leukemia. *Blood Cancer Journal.* 3:137.
- 89) Mishra A., Liu S., Sams GH., et al. (2012). Aberrant overexpression of IL-15 initiates large granular lymphocyte leukemia through chromosomal instability and DNA hypermethylation. *Cancer Cell.*22 (5):645-55.
- 90) Wang X., Lee D., Wang Y., et al. (2012). Membrane-bound interleukin-21 and CD137 ligand induce functional human natural killer cells from peripheral blood mononuclear cells through STAT-3 activation. *Clinical and Experimental Immunology.* 172:104–12.
- 91) Shah N., Baird K., Delbrook C., et al.(2015). Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following T-cell–depleted stem cell transplantation. *Blood.*125 (5):784-92.
- 92) Sarkar S., Gelder M., Noort W., et al. (2015). Optimal selection of natural killer cells to kill myeloma: the role of HLA-E and NKG2A. *Cancer Immunol Immunother.*64 (8):951–63.
- 93) Wieten L., Mahaweni NM., Voorter CE., Bos GM., Tilanus MG. (2014). Clinical and immunological significance of HLA-E in stem cell transplantation and cancer. *Tissue Antigen.*84 (6):523–35.

- 94) Godal R., Bachanova V., Gleason M., et al. (2010). Natural killer cell killing of acute myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia blasts by killer cell immunoglobulin-like receptor-negative natural killer cells after NKG2A and LIR-1 blockade. *Biol Blood Marrow Transplant.* 16 (5):612–21.
- 95) Ruggeri L., Urbani E., André P., et al. (2016). Effects of anti-NKG2A antibody administration on leukemia and normal hematopoietic cells. *Haematologica.* 101(5):626-33.
- 96) Sykes M., Harty MW., Szot GL., Pearson DA. (1994). Interleukin-2 inhibits graft versus-host disease-promoting activity of CD4⁺ cells while preserving CD4- and CD8-mediated graft-versus-leukemia effects. *Blood.* 83 (9): 2560-69.
- 97) Zhang Y., Joe G., Hexner E., Zhu J., Emerson SG. (2005). Host-reactive CD8⁺ memory stem cells in graft-versus-host disease. *Nat Med.* 11 (12):1299-305.
- 98) Munker R., Schmid C., Madrigal JA., Kolb HJ. (2004). An update on graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactions: a summary of the sixth International Symposium held in Schloss Ellmau, Germany. *Bone Marrow Transplant.* 34 (9):767-80.
- 99) Storb R., Gyurkocza B., Storer BE., et al. (2013). Graft-versus-host disease and graft versus- tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol.* 31 (12):1530-8.
- 100) Hijiya N., Thomson B., Isakoff MS., et al. (2011). Phase 2 trial of clofarabine in combination with etoposide and cyclophosphamide in pediatric patients with refractory or relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 118 (23):6043-49.
- 101) Messinger Y., Boklan J., Goldberg J., et al. (2017). Combination of clofarabine, cyclophosphamide, and etoposide for relapsed or refractory childhood and adolescent acute myeloid leukemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 34 (4):187-98.
- 102) Tavit B., Aytac S., Balci YI., et al. (2010). Fludarabine, cytarabine, granulocyte colony-stimulating factor, and idarubicin (FLAG-IDA) for the treatment of children with poor-prognosis acute leukemia: the Hacettepe experience. *Pediatr Hematol. Oncol.* 27 (7):517-28.
- 103) Pfeiffer MM., Feuchtinger T., Teltschik HM., et al. (2010). Reconstitution of natural killer cell receptors influences natural killer activity and relapse rate after haploidentical transplantation of T- and B-cell depleted grafts in children. *Haematologica.* 95 (8):1381-8.
- 104) Pollyea DA., Gutman JA., Gore L., Smith CA., Jordan CT. (2014). Targeting acute myeloid leukemia stem cells: a review and principles for the development of clinical trials. *Haematologica.* 99 (8):1277-84.
- 105) Fernández L., Valentín J., Zalacain M., et al. (2015). Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner. *Cancer Lett.* 368 (1):54-63.
- 106) Yang Q., Goding SR., Hokland ME., Basse PH. (2006). Antitumor activity of NK cells. *Immunol Res.* 36 (1-3):13-25.

- 107) Pérez-Martínez A., de Prada I., Fernández L., et al. (2012). Natural killer cells can exert a graft-vs-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric solid tumors. *Exp Hematol.*40 (11):882-91.

ANEXOS



A phase I/II trial of interleukin-15–stimulated natural killer cell infusion after haplo-identical stem cell transplantation for pediatric refractory solid tumors

ANTONIO PÉREZ-MARTÍNEZ¹, LUCÍA FERNÁNDEZ², JAIME VALENTÍN³, ISABEL MARTÍNEZ-ROMERA⁴, MARÍA DOLORES CORRAL⁴, MANUEL RAMÍREZ^{5,6}, LOREA ABAD⁶, SANDRA SANTAMARÍA⁵, MARTA GONZÁLEZ-VICENT⁶, SARA SIRVENT⁷, JULIÁN SEVILLA⁶, JOSÉ LUIS VICARIO⁸, INMACULADA DE PRADA⁹ & MIGUEL ÁNGEL DÍAZ⁶

¹Department of Pediatric Hemato-Oncology and Stem Cell Transplantation, Hospital Infantil Universitario La Paz, Madrid, Spain, ²Clinical Research Program, Cancer Research National Centre, Madrid, Spain, ³Innate Immune Research Group, IdiPAZ, Madrid, Spain, ⁴Pediatric Department, Universidad Autónoma, Madrid, Spain, ⁵GMP Facility, Department of Hemato-Oncology and Stem Cell Transplantation, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain, ⁶Department of Hemato-Oncology and Stem Cell Transplantation, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain, ⁷Department of Radiology, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain, ⁸Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain, and ⁹Department of Pathology, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain

Abstract

Background aims. Preliminary data suggest that T-cell–depleted haplo-identical stem cell transplantation (haplo-SCT) has a clinically beneficial allograft-versus-tumor effect associated with natural killer (NK) cell immune reconstitution. **Methods.** This phase I/II trial descriptively evaluates the feasibility of interleukin (IL)-15–stimulated NK cell infusion after haplo-SCT in pediatric patients with refractory solid tumors. **Results.** Six patients received an IL-15–stimulated NK cell infusion at 30 days after haplo-SCT. The mean number of infused NK cells per product was $11.3 \times 10^6/\text{kg}$ (range, $3\text{--}27 \times 10^6/\text{kg}$). The T-cell count was $<1 \times 10^7/\text{kg}$ in all patients (range, $0\text{--}0.75 \times 10^7/\text{kg}$). No toxic effects related to IL-15–stimulated NK cell infusion were observed. Four of the six patients showed a clinical response (one achieved very good partial remission, two achieved partial remission and one had stable disease). One patient had progressive disease, and the response was not evaluated in the remaining patient. After a median follow-up period of 310 days, all patients had died: four of cancer relapse, one of cancer-associated thrombotic micro-angiopathy and one of acute graft-versus-host disease. **Conclusions.** The adoptive transfer of allogeneic IL-15–stimulated NK cells might be feasible and safe in heavily pretreated pediatric patients with refractory solid tumors, though the advanced stage of disease and toxic effects of haplo-SCT may limit the efficacy of NK cell infusion in this population.

Key Words: haplo-identical stem cell transplantation, IL-15–stimulated NK cells, pediatric solid tumors

Introduction

The use of natural killer (NK) cells in anti-cancer therapy has been reported by a number of studies over the past decade [1]. NK cells are known to play an important role in the control of malignancy [2]. Preclinical data indicate that adoptive allogeneic NK cells can induce an anti-tumor effect without causing graft-versus-host disease (GvHD) [2,3]. Ruggeri *et al.* [4] reported that donor allo-reactive NK cell transplantation reduced graft rejection, enhanced

engraftment and mediated a graft-versus-leukemia effect in the absence of GvHD after haplo-identical stem cell transplantation (haplo-SCT) in adult acute myeloid leukemia. These results were also observed after haplo-SCT in pediatric acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia and have been suggested to occur in pediatric patients with solid tumors [5,6]. This haplo-SCT graft-versus-tumor effect is mediated in part by donor NK cell immune reconstitution. Prior data from our group

Correspondence: Antonio Pérez-Martínez, MD, PhD, Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica, Hospital Infantil Universitario La Paz, Paseo de la Castellana 261, Madrid 28046, Spain. E-mail: aperezmartinez@salud.madrid.org

(Received 28 May 2015; accepted 18 July 2015)

ISSN 1465-3249 Copyright © 2015, International Society for Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.07.011>

showed a clinically beneficial graft-versus-tumor associated with NK cell donor–recipient killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR)–human leukocyte antigen (HLA)-I mismatch and with interactions between activator receptors on NK cells (NKG2D) and their ligands on tumor cells [6,7]. The first adoptive haplo-identical NK cell infusion trial in patients with cancer was reported by Miller *et al.* [8]. Rubnitz *et al.* [9] reported encouraging results after haplo-identical NK cell infusions as a consolidation therapy in pediatric patients with acute myeloid leukemia in their first complete remission.

Most reported trials of NK cell transplantation administered interleukin (IL)-2 to stimulate infused NK cells after lympho-depleting chemotherapy [10]. Recently, it has been shown that human recombinant IL-15 and IL-2 can be safely administered to patients with metastatic malignancies, increasing NK cells [11,12]. Although long-term low-dose IL-2 subcutaneous application is feasible and safe, we were concerned about the occurrence of GvHD after HLA-mismatched transplantation [13]. The rationale of the use of *ex vivo* IL-15 stimulation is based on the aim to enhance NK cell cytolytic and immune reconstitution after haplo-SCT, avoiding GvHD [14,15]. However, little is known about the effects of NK cell infusion after haplo-SCT. Encouraging results were reported after IL-2–stimulated NK cell transplantation in patients with hematological malignancies [16]. A recent study from a German group suggested that activation or expansion of NK cells may be required to attain a clinical benefit after haplo-SCT, especially because most NK cells remain immature and hypo-functional after haplo-SCT [17]. Therefore, patients who have undergone haplo-SCT appear to be good candidates for stimulated haplo-identical NK cell infusion to improve NK cell reconstitution and enhance the anti-tumor effect of treatment [18].

Isolation of pure donor NK cells and stimulation of these cells *ex vivo* under Good Manufacturing Practice (GMP) conditions before infusing the cells into the patient is now feasible and may improve *in vitro* the functional anti-tumor effect of the NK cells [19,20]. Such improvement of the anti-tumor effect should be important because pediatric refractory solid tumors currently have a very poor survival rate. For example, patients with recurrent sarcoma have a long-term survival rate of <20% and a <10% chance of survival if relapse occurs within 2 years [21]. Laboratory and preliminary clinical data suggest that most of these pediatric malignancies are susceptible to NK cell cytotoxicity [22,23].

Therefore, we designed a phase I/II single-center clinical trial with a main objective to evaluate the feasibility and safety of highly purified

IL-15–stimulated NK cell infusion after haplo-SCT in pediatric refractory solid tumors.

Methods

Clinical protocol

The Spanish Medicines and Health Products Agency (AEMPS) and our local ethics committee approved the study protocol. The guardians of all the patients provided fully informed written consent for participation in the study. Informed written consent was also obtained from all donors before apheresis for hematopoietic stem cell and NK cell isolation. The study was registered at ClinicalTrials.gov (Identifier number: NCT01337544; N°EudraCT: 2009–010186–23). Six of the 10 planned patients were enrolled in the study. The clinical study was halted as a consequence of the patrimonial claim presented by the parents of two patients, an organizational problem not related to patient care or research practices. Because the rate of claims was higher than we judged to be acceptable for further development of the study, the institution (Hospital Infantil Universitario Niño Jesús) decided to interrupt it and not to re-open it at a later date and to report results of this small series that could be relevant for the clinical community, considering the considerable challenges of including children with this stage of disease into complex clinical trials.

Between February 2011 and July 2013, six patients with refractory solid tumors (three with Ewing sarcoma, one with undifferentiated sarcoma, one with refractory osteosarcoma and one with adrenal cell carcinoma) underwent haplo-SCT at the Stem Cell Transplantation Unit of Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain. All patients had progressive disease before transplantation. Patient characteristics are shown in Table 1. Patients received a conditioning regimen including fludarabine (150 mg/m²), intravenous busulfan (3.2–4.8 mg/kg/d for 2 days, depending on body weight), thiotepa (10 mg/kg) and methylprednisolone (4 mg/kg/d for 5 days). We did not use serotherapy in any of these transplantations. All patients received peripheral blood stem cells. The haplo-identical donor was selected according to the following strategy (in order of preference): (i) donor inhibitory KIR receptors and patient HLA-I ligand mismatch model were desired; (ii) in the case of KIR-HLA match setting, we sought KIR B haplotype donors; (iii) if (i) and (ii) were not conclusive, we chose the haplo-identical donor who had the highest cytotoxicity activity against K562 cell line *in vitro*. Donor cells were mobilized through the use of granulocyte colony-stimulating factor (non-glycosylated G-CSF; Amgen) as previously reported [24].

Table I. Patient characteristics.

Patient	Sex	Age	Diagnosis	Previous chemotherapy regimens	Status before haplo-SCT
1	Male	15	ES (fibula) + bone and lung metastases	SEOP-EW01, T+I, G+D, T+I+RT	Progressive disease
2	Female	11	US (sacrum) + lung metastasis	EpSSG RMS-2005+RT, To+C, surgery, V+Ccf, T+I, Ccf+VP16	Progressive disease
3	Male	15	Osteosarcoma (femur) + lung metastasis	EURAMOS+surgery, interferon B, I+VP16	Progressive disease
4	Female	15	ES (sacroiliac) + bone, hepatic and lung metastases	SEOP-EW01+HDCT+RT, T+I	Progressive disease
5	Male	13	Suprarenal carcinoma + peritoneal lymph nodes	Surgery+RT+mitotane+ARAR0332	Progressive disease
6	Male	16	ES (tibia) + lung metastasis	SEOP-EW01+ RT, T+I	Progressive disease

Haplo-SCT, haplo-identical stem cell transplantation; ES, Ewing sarcoma; US, undifferentiated sarcoma; T+I, temozolomide plus irinotecan; G+D, gemcitabine plus docetaxel; RT, radiotherapy; To+C, topotecan plus carboplatin; V+C, vincristine plus cyclophosphamide; Ccf+VP16, cyclophosphamide plus etoposide; I+VP16, ifosfamide plus etoposide; HDCT, high-dose chemotherapy and autologous stem cell rescue.

Graft manipulation was performed by means of cluster of differentiation (CD)3/CD19 depletion (CliniMACS; Miltenyi Biotec). Our GvHD prophylaxis regimen consisted of cyclosporine A (CsA) at a dose of 3 mg/kg/d given intravenously from day -1. The administration of CsA was tapered as soon as possible, typically before day 30.

All patients received NK cells at day 30. Only patients 1 and 2 received an additional NK cell infusion at day 90 because they had a very good clinical response to the first IL-15-stimulated NK cell infusion. At 30 days after haplo-SCT, NK cells were obtained by unstimulated leukapheresis from the same haplo-identical donor. Cytokines were not administered after the IL-15-stimulated NK cell infusion. The *ex vivo* purification procedure (CliniMACS cell selection system) comprised CD3 depletion followed by CD56⁺ cell selection. At each step, the percentages and absolute numbers of viable NK and T cells were analyzed by means of flow cytometry. Fresh and highly purified NK cells were incubated *ex vivo* overnight with 10 ng/mL of IL-15 (GMP Recombinant rh IL-15; CellGenix) to obtain stimulation but no proliferation cells. For quality control, the final IL-15-stimulated NK cell product was required to have an NK cell phenotype by flow (CD56⁺CD3⁻) >80%, a cytotoxic activity of >50% specific lysis of K562 cells at a ratio of 8:1, viability of >70%, <100 × 10³ T cells/kg and be sterile on microbiological testing. Patients were assessed for immediate adverse reactions, GvHD and immune reconstitution on day 30 after haplo-SCT (before IL-15-stimulated NK cell infusion) and on days 60 and 90. Response evaluation according to the revised RECIST criteria was performed on day 30 after haplo-SCT (before IL-15-stimulated NK cell infusion) and on day 90 after haplo-SCT. After evaluation on day 90, the clinicians decided if the patients could benefit from additional IL-15 NK cell infusion.

Flow cytometric analysis and tumor immunohistochemical analysis

Flow cytometric analysis was performed by means of multiparametric flow cytometry (FACSCanto II, Becton Dickinson) to assess immune reconstitution after haplo-SCT. The NK cell isolation procedure was performed as described previously [25]. The following fluorochrome-labeled monoclonal antibodies (mAbs) against human antigens were obtained from Becton Dickinson: CD3 phycoerythrin (PE)-Cy7, CD158b1 fluorescein isothiocyanate (FITC), CD20-PE, CD45-FITC, CD69-FITC, NKG2D-alllophycocyanin (APC), CD45RA-PE-Cy5, CD127-APC, CD27-APC and CCR7-PE. Fluorochrome-labeled mAbs against CD19-PE, CD56-APC, CD25-PE, CD158 a/h-PE and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) were obtained from Beckman Coulter. Fluorochrome-labeled mAbs against CD158e (KIR 3DL1)-PE, CD69-PE and D337 (NKp30)-PE were obtained from Miltenyi Biotec. Fluorochrome-labeled mAbs against Toll-like receptor (TLR)4 and TLR9 were obtained from Enzo Life Sciences AG.

The expression levels of Major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A (MICA) and UL16-binding protein 2 (ULBP2) were assessed by means of tissue microarray as described previously [7,26].

NK cell alloreactivity (HLA-I type, KIR haplotype and NK cell cytotoxicity)

The presence of patient HLA-C (C1 and C2) and HLA-B (Bw4) ligands for donor KIR receptors was determined through the use of high-resolution polymerase chain reaction (PCR) sequence-based typing. Fifteen human KIR genes and two pseudogenes were analyzed in donors by means of PCR with the use of

a KIR typing kit (Miltenyi Biotech, Inc). On the basis of their gene content, KIR genotypes can be divided into two broad haplotypes termed A and B [27].

The natural cytotoxicity of NK cells was measured with the use of a conventional 2-h europium-TDA (2,2':6',2''-terpyridine-6,6''diacarbonylic acid) release assay (Perkin Elmer Wallac) against K562 (an erythroleukemia cell line) as described previously [28]. The ratio between donor and patient resting NK cell cytotoxicity before haplo-SCT was recorded (Table II).

Engraftment and chimerism

Hematopoietic recovery after transplantation was defined as an absolute neutrophil count of $\geq 0.5 \times 10^9/L$ on 3 consecutive days and an unsupported platelet count of $\geq 20 \times 10^9/L$ on 7 consecutive days. Hematopoietic donor cell chimerism studies were carried out on genomic DNA obtained from peripheral blood mononuclear cells with the use of Ficoll density gradient centrifugation. Samples were amplified by means of PCR with a panel of six single-tandem repeats and a variable number of tandem repeat markers.

Results

Clinical outcomes after haplo-SCT

Patients received CD3/CD19-depleted grafts with a mean $CD34^+$ stem cell number of $3.05 \times 10^6/kg$ (range, $1.9-6.5 \times 10^6/kg$), mean $CD3^+$ T-cell number of $9.7 \times 10^3/kg$ (range, $3-14 \times 10^3/kg$) and median $CD3^+/CD56^+$ NK cell number of $31.44 \times 10^6/kg$ (range, $13-87 \times 10^6/kg$) (Table III and Supplementary Figure 1). The haplo-identical donor was the patient's mother in three cases, the patient's father in two cases and the patient's brother in one case. Donor-recipient sex mismatch was present in five pairs. HLA-I/KIR mismatch was present only in patient 6. Three donors had group B KIR haplotypes. The resting donor/recipient ratio of NK cell cytotoxicity against the K562 cell line was diminished in four of five patients. NKG2D ligands were over-expressed in four patients (Table II).

Neutrophil engraftment was rapid, taking a mean time of 13 days (range, 11–15 days), and platelet

IL-15 NK cells after haplo-SCT for solid tumors 1597

independence was achieved after a mean time of 11 days (range, 9–15 days). Supportive care included a mean of three blood transfusions (range, 1–7) and three platelet transfusions (range, 1–8). The mean period of severe neutropenia was 9 days (range, 6–14 days). The mean length of hospital stay after haplo-SCT was 20 days (range, 12–52 days). The complications recorded before the IL-15–stimulated NK cell infusion included febrile neutropenia in two patients, rotavirus diarrhea in one patient, hemorrhagic cystitis in one patient and thrombotic micro-angiopathy in one patient (Table III). Three patients had development of severe acute GvHD (aGvHD). In all cases, GvHD occurred before the IL-15–stimulated NK cell infusion. The number of T cells in the graft was $<15 \times 10^3/kg$ in all cases. Full donor chimerism ($>95\%$) was obtained in five of the six patients. Patient 5 had 15% autologous chimerism of T cells on days 30 and 60 and was diagnosed with aGvHD before the IL-15–stimulated NK cell infusion.

Safety of IL-15–stimulated NK cell infusion

On day 30 after haplo-SCT, all patients received a mean of $11.3 \times 10^6/kg$ (range, $3-27 \times 10^6/kg$) fresh and highly purified IL-15–stimulated NK cells from the same donor (Table IV). In all cases, purity and viability were $>90\%$ (range, 91.5% to 97.8% and 90.4% to 100%, respectively). All products were sterile according to microbiological testing recommendations. T-cell contamination was $<1 \times 10^3/kg$ in all cases (range, $0-0.75 \times 10^3/kg$; Supplementary Figure 2). The *in vitro* cytotoxicity against K562 cell line was optimal (lysis rate of 80%, 66%, 55% and 36%) at an effector:target ratio of 8:1, 4:1, 2:1 and 1:1, respectively. The IL-15–stimulated NK cells expressed activation markers CD69 (11%), CD25 (2%) and NKG2D (87%).

The IL-15–stimulated NK cell infusion was well tolerated, and no immediate adverse effects were observed. Before the IL-15–stimulated NK cell infusion, three patients were diagnosed with aGvHD greater than grade II. In these three patients, immunosuppression was maintained and the degree of aGvHD did not change after the IL-15–stimulated NK cell infusion. KIR 2DL1/3DL1 mismatch was

Table II. Haplo-identical donors and patient/donor NK cell alloreactivity.

Patient	Donor	Donor/patient NK cell cytotoxicity	Donor KIR type	Patient HLA-I	KIR-HLA mismatch	Tumor MICA/ULBP2
1	Mother	10	B (2DS1/2DS2/3DS1)	C1C2Bw4	No	++/+
2	Brother	3	A	C1C2Bw4	No	++
3	Father	2	Not evaluated	C1C2Bw4	No	+++ / ++
4	Father	Not evaluated	B (2DS2/3DS1)	C1C2Bw4	No	–/–
5	Mother	1	B (2DS2)	C1C2Bw4	No	++++
6	Mother	25	A	C1C1Bw6	Yes (2DL1 and 3DL1)	Not evaluated

1598 A. Pérez-Martínez et al.

Table III. Haplo-identical graft composition and early outcomes after haplo-SCT.

Patient	CD34 × 10 ⁶ /kg	CD3 × 10 ⁶ /kg	CD19 × 10 ⁶ /kg	CD56 × 10 ⁶ /kg	Early complications
1	2.78	0.0063	0.00378	15.46	Fever
2	1.99	0.01187	0.015	13.6	Fever, aGvHD III
3	2.1	0.01415	0.03537	31.5	<i>E faecium</i> , rotavirus, aGvHD III
4	6.5	0.013	0.02666	87.04	Hemorrhagic cystitis
5	2	0.00394	0.01	18.32	aGvHD III
6	2.92	0.0093	0.082	22.72	Micro-angiopathy, aGvHD II

Haplo-SCT, haplo-identical stem cell transplantation; aGvHD, acute graft-versus-host disease.

present in patient 6. This patient had cancer-associated thrombotic micro-angiopathy before receiving the conditioning regimen, which did not change after the IL-15-stimulated NK cell infusion.

Because patients 1 and 2 had a very good clinical response to the first IL-15-stimulated NK cell infusion, they received a second infusion with a mean number of $2.1 \times 10^6/\text{kg}$ (range, $1.4\text{--}2.8 \times 10^6/\text{kg}$) freshly isolated, highly purified IL-15-stimulated NK cells, which was well tolerated. Re-activation of GvHD was not observed in either case.

Efficacy of haplo-SCT and IL-15-stimulated NK cell infusion

After this approach, one patient (patient 1) achieved very good partial remission lasting 10 months and two patients achieved partial remission lasting 14 (patient 2) and 4 (patient 6) months, respectively. Patient 3 achieved disease stability for 4 months, and patient 4 had disease progression during the second month after haplo-SCT. The response could not be evaluated in patient 5 because severe GvHD precluded moving the patient to another hospital to perform positron emission tomography-CT. The best clinical response was observed in lung metastases (Figure 1). All patients died after a median time of 310 days (range, 39–772 days): two of transplant-related complications, one of aGvHD, one of severe thrombotic micro-angiopathy and four of disease progression (Table IV).

Immune reconstitution was assessed in all patients (Figure 2 and Supplementary Table I). On day 30,

NK cells dominated the lymphocyte immune reconstitution ($237 \pm 80/\mu\text{L}$, 77% dim and 12% bright). NKG2D, NKp30, TLR4 and TLR9 were expressed on 79%, 28%, 41% and 87% of NK cells, respectively, and the activation markers CD25 and CD69 were expressed on 6% and 4%, respectively. On day 30, T cells represented the second largest lymphoid population ($116 \pm 56/\mu\text{L}$), consisting mostly of CD8⁺ T cells ($99 \pm 51/\mu\text{L}$) with a predominant effector memory phenotype ($68 \pm 39/\mu\text{L}$). On day 60, there was no increase in NK cell numbers, but these cells still represented the predominant lymphocyte population ($215 \pm 864/\mu\text{L}$, 83% dim and 8% bright). NKG2D, NKp30, TLR4 and TLR9 were expressed on 81%, 30%, 71% and 82% of NK cells, respectively, and CD25 and CD69 were expressed on 1% and 7%, respectively. There was a significant decrease in T-cell numbers between days 30 and 60 to $37 \pm 6/\mu\text{L}$, of which most were CD8⁺ T cells ($20 \pm 5/\mu\text{L}$). On day 90, T cells were the predominant lymphocyte population ($1692 \pm 1109/\mu\text{L}$). Most T cells were CD8⁺ ($1470 \pm 980/\mu\text{L}$) with an effector memory phenotype ($1313 \pm 867/\mu\text{L}$). On day 90, NK cell numbers had also increased ($413 \pm 269/\mu\text{L}$, 73% dim and 10% bright). NKG2D, NKp30, TLR4 and TLR9 were expressed on 87%, 35%, 66% and 75% of NK cells, respectively, and CD25 and CD69 were expressed on 7% and 1%, respectively. The numbers of T-regulatory cells increased slowly: $1 \pm 0.8/\mu\text{L}$ on day 30, $2 \pm 1/\mu\text{L}$ on day 60 and $11 \pm 8/\mu\text{L}$ on day 90.

In patient 6, KIR2DL1 and KIR3DL1 expression was also assessed. On day 30, only a small proportion

Table IV. Outcomes after IL-15-stimulated NK cell infusion.

Patient	IL-15 NK × 10 ⁶ /kg	Early complications after IL-15 NK cell infusion	Infections after NK cell infusion	Response	Status	Time to death (days)
1	6.37	No	No	VGPR	DOD	313
2	3.45	No	No	PR	DOD	772
3	21.26	No	Yes (cytomegalovirus)	SD	DOD	115
4	29.34	No	No	PD	DOD	39
5	4.12	No	No	Not evaluated	TRM	87
6	3.06	No	Yes (cytomegalovirus, adenovirus, HSV-6)	PR	TRM	103

VGPR, very good partial remission; PR, partial remission; SD, stable disease; PD, progressive disease; HSV-6, herpes simplex virus type 6; DOD, died of disease; TRM, transplant related toxicity.

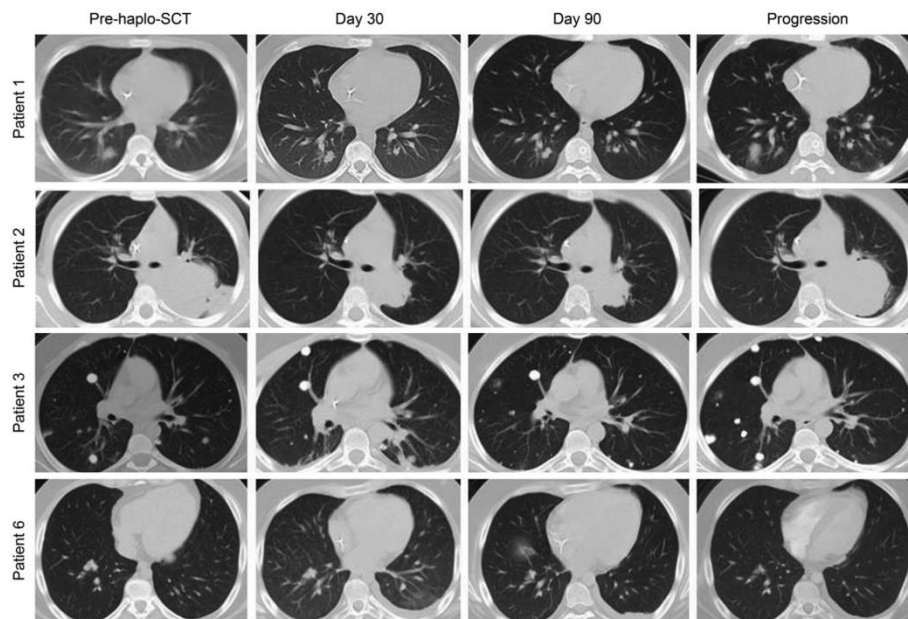


Figure 1. Left to right: thoracic computed tomography images before haplo-identical stem cell transplantation, at 30 and 90 days after IL-15-stimulated natural killer cell infusion and after progression of lung metastases. Patients 1, 2 and 6 achieved a partial response (30% size reduction of target lesions) and patient 3 had stable disease (no reduction of the target lesions). Patient 1 achieved a partial response with reduction in size of the right lower lobe nodule, followed by disease progression with increase in size of the right lower lobe nodule. Patient 2 achieved a partial response with a large reduction in size of the left lower lobe mass, followed by disease progression with an increase in size of the posterior mass. Patient 3 had stable disease with no changes in size of the lung metastases during the study period. Patient 6 achieved a partial response with reduction in size of the right lower lobe nodule, followed by disease progression with new pleural effusions and multiple new lung nodules (not shown).

of NK cells expressed these receptors (2% and 3%, respectively), and monitoring of these receptors was discontinued.

Immune reconstitution was assessed 30 days after the second IL-15-stimulated NK cell infusion in patients 1 and 2. In these patients, T cells dominated the lymphocyte immune reconstitution ($2355 \pm 2115/\mu\text{L}$). Most of the T cells were CD8^+ ($1814 \pm 1717/\mu\text{L}$). The NK cell numbers remained stable ($392 \pm 301/\mu\text{L}$, 87% dim and 1% bright). NKG2D, NKP30, TLR4 and TLR9 were expressed on 94%, 5%, 46% and 95% of NK cells, respectively, and CD25 and CD69 were not expressed.

Discussion

It has been suggested that adoptive immunotherapy with the use of NK cells reduces the rate of graft failure and improves the anti-tumor effects after haplo-SCT

[18,29]. However, infusion of unstimulated NK cells has a limited clinical effect. In the current study, we report the results of a small series of six pediatric patients with refractory solid tumors uniformly treated with haplo-identical IL-15-stimulated NK cell infusion after haplo-SCT. IL-15-stimulated NK cell infusion appeared to be safe and feasible. No toxicity related to IL-15-stimulated NK cell infusion was observed. Three of the six patients had aGvHD greater than grade II before the IL-15-stimulated NK cell infusion. Because all grafts included a low number of T cells, it is likely that aGvHD was caused by these T cells rather than by the NK cells. However, the number of T cells in the graft was $<15 \times 10^3/\text{kg}$ in all cases. In addition, T-cell reconstitution at day +30 was lower than in previous studies [25–30]. It is reasonable to speculate that grafts from HLA-mismatched donors and progressive disease and heavily pretreated patients favored the development of aGvHD [31,32]. We consider it highly unlikely that IL-15 NK cell infusion

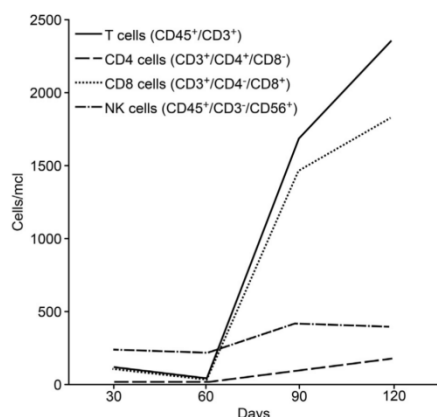
1600 A. Pérez-Martínez *et al.*

Figure 2. Reconstitution of NK cells, T cells and T-cell subsets (CD4⁺ and CD8⁺ cells) after haplo-identical stem cell transplantation (haplo-SCT) followed by IL-15-stimulated NK cell infusion after 30 days. In all patients, immune reconstitution was assessed on days 30, 60 and 90 after haplo-SCT. Patients 1 and 2 received a second IL-15-stimulated NK cell infusion on day ≥ 100 after haplo-SCT, and in these patients immune reconstitution was also assessed on day 120 after haplo-SCT.

may augment aGvHD. In fact, patient 2, who had development of aGvHD before IL-15 NK cell infusion, did not increase aGvHD after the first infusion, and a second IL-15-stimulated NK cell infusion did not induce aGvHD recurrence. Furthermore, the combination of aGvHD and CD3⁺ autologous chimerism of 15% in patient 5 is uncommon. Although the full spectrum of activating receptor ligands and their biology remains to be elucidated, it is well known that cellular stress leads to upregulation of activating receptor ligands, both on malignant and non-malignant tissues. Recently, an unexpected aGvHD after IL-15/4-1BBL-activated NK cell infusion after T-cell-depleted HLA match transplantation was reported. The authors hypothesized the possibility that previous inflammation and/or cellular stress may have increased activating-receptor ligand expression on non-malignant tissues [33].

There are a number of differences between our study and some previous reports on the use of NK cells after haplo-SCT. First, in most of the previously reported studies, NK cells have been stimulated with IL-2. The rationale of using *ex vivo* IL-15 stimulation is based on two key factors: (i) IL-15 constitutes a major physiologic growth factor responsible for NK cell differentiation, survival and cytolytic activity of mature NK cells and (ii) IL-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation [14,15]. It has recently been reported that

recombinant human IL-15 (daily intravenous bolus infusion for 12 consecutive days) could be safely administered to patients with metastatic malignancy; it markedly altered homeostasis of lymphocyte subsets in blood, with NK cells and $\gamma\delta$ cells most dramatically affected, followed by CD8 memory T cells. Indications of activity included clearance of lung lesions in two patients [12].

We intended to improve the graft-versus-tumor effect as suggested for some previous studies [34,35]. The preliminary results in our small sample of pediatric patients with refractory solid tumors (predominantly sarcomas) are encouraging. An objective clinical response was observed in four patients. In one patient (patient 2), a decrease in the size of the lung metastasis was observed after a second freshly isolated IL-15-stimulated NK cell infusion. These results were achieved without any further conditioning regimens and without increasing the number of peripheral blood NK cells, suggesting that NK cells traffic into or become trapped in the lungs [36]. The results also suggest that the IL-15-stimulated NK cell infusion was at least partially responsible for the decrease in tumor size in patient 2 because this occurred after the second infusion even though no second conditioning regimen was administered. In patient 1, residual disease was observed in the left fibula on computed tomography after the first IL-15-stimulated NK cell infusion, which was not eliminated after the second IL-15-stimulated NK cell infusion. This result suggests that the initial clinical response observed may have resulted from the combination of the conditioning regimen and the IL-15-stimulated NK cell infusion. Therefore, any clinical benefit from additional IL-15-stimulated NK cell infusions may be restricted to reducing the extent of lung metastases. Although it is not possible to know the mechanism of action of the NK cells in such a small number of patients, we hypothesize that the mechanism underlying the response to haplo-SCT and IL-15-stimulated NK cell infusion may have been a tumor-ligand interaction involving activator receptors in patients 1, 2 and 3 and may have been related to the KIR/HLA-I mismatch in patient 6 [7,18] and also NKG2D ligands overexpression in patients 1, 2, 3 and 6. However, graft-versus-tumor effect could not be predicted in patient 4 because of the HLA-I/KIR match and the absence of NKG2D ligands on tumor cells on immunohistochemical examination. This patient had no clinical response.

In addition, the anti-tumor effect of the entire approach may have been more robust than we were able to demonstrate because it may have been compromised by the immunosuppressive drugs administered for aGvHD prophylaxis and treatment. Although IL-15-stimulated NK cells are more

resistant than IL-2 NK cells to the lytic effects of steroid treatment [37], all patients were receiving immunosuppressive drugs, a factor that probably diminished the additional anti-tumor potential of other leukocytes.

Our GvHD prophylaxis regimen consisted of CsA at a dose of 3 mg/kg/d given intravenously from day -1. The administration of CsA was tapered as soon as possible. NK cell activity after stem cell transplantation has been shown to have potential activity against leukemia but also Ewing sarcoma [38,39]. Previous reports demonstrate that NK cells cultured in the presence of CsA retained their cytotoxic capabilities [40–44]. However, there are contradictory reports in the literature [45–47]. It can be suggested that NK cell stimulation occurs through multiple pathways of intracellular activation (including protein kinase C and calcineurin pathways) [48]. The potent inhibitory effects of mycophenolate mofetil (MMF) on NK cell proliferation and cytotoxic activity are apparently more evident than those of other immunosuppressants, including CsA, tacrolimus and methotrexate [49]. The NK-activating receptor expression of NK cells is downregulated by MMF, and the inhibitory effect is partially abrogated. The NKP30 expression level has been reported to correlate with the cytotoxic function of NK cells [50]. Regarding immune reconstitution, the lack of expansion of NK cells *in vivo* after IL-15-stimulated NK cell infusion may be related to the lack of IL-2 injection. However, we did not use IL-2 *in vivo* stimulation to avoid the risk of GvHD after HLA-mismatched transplantation. Although we did not detect NK cell proliferation suggesting that the infusion did not result in NK cell proliferation, we observed an unusual decrease in T-cell expansion after 60 days in combination with an increase in the dim NK cell population [28]. These data suggest a predominance of NK cell alloreactivity early after IL-15-stimulated NK cell infusion. Later, when T cells had recovered, they competed with NK cell stimulation and decreased NK cell-mediated alloreactivity even after a second IL-15-stimulated NK cell infusion. The changes observed in T-regulatory cell numbers differed from those observed when IL-2 was used to stimulate NK cells [1,16,17]. T-cell expansion depends on the CD8 effector memory cell compartment on day 90 and may limit NK cell expansion and prevent any NK cell anti-tumor effect.

Regarding timing of NK cell infusion after haplo-SCT, in the current study, we infused at day 30 after stem cell transplantation with the intention of enhancing NK cell recovery. At this stage, NK cells lead to lymphocyte population recovery; therefore we boost them to improve NK cell numbers and anti-tumor cytotoxicity. However, the optimal timing for

NK cell infusion remains unclear. Some groups propose infusion on day 7 after haplo-SCT, suggesting that early infusion may improve engraftment and prevent the development of GvHD. In our patients, engraftment was not problematic, but earlier IL-15-stimulated NK cell infusion may have resulted in reduction of GvHD [51].

It should be stressed that the small number of patients must be taken in consideration as a major limitation of our study. In addition, haplo-SCT is not a standard treatment for progressive solid tumors of childhood. Considering the results of this small clinical series of heavily pretreated patients, we may conclude that IL-15-stimulated NK cell infusion at 30 days after haplo-SCT could be feasible and safe for pediatric patients with refractory solid tumors. Severe toxic effects described in our study such as aGvHD and thrombotic micro-angiopathy occurred after haplo-SCT and did not show any association with IL-15-stimulated NK cell infusion. In our work, lung metastases respond better to haplo-SCT and IL-15-stimulated NK cell infusion than other metastases, possibly because NK cells are engrafted only in the lungs.

To our knowledge, this small study is the first to highlight the feasibility of IL-15-stimulated NK cellular immune therapy in this difficult-to-treat patient group. Such extremely high-risk patients have no chance to survive their disease with the current treatment approach; consequently, innovative concepts are needed. In our opinion, selected patients with a small tumor burden, predicted NK cell alloreactivity based on donor NK cell interactions and relatively good clinical status may benefit from this treatment approach. However, further studies with larger patients cohorts are needed to determine the optimal dosage, timing and trafficking of NK cells for anti-tumor activity in pediatric patients with refractory solid tumors.

Acknowledgments

We would like to thank Dr Leung from St Jude Children's Research Hospital for critically reviewing the manuscript and ServingMed.com for providing English language editing of the manuscript.

This work was supported by a National Health Service of Spain grant (FIS EC81/00457), the CRIS Cancer Foundation (<http://criscancer.org>) and the "La hucha de Tomás" project (<http://www.lahuchadetomas.com>).

Disclosure of interests: The authors have no commercial, proprietary, or financial interest in the products or companies described in this article.

References

- [1] Miller JS. Therapeutic applications: natural killer cells in the clinic. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; 2013:247–53.
- [2] Koh CY, Welniak LA, Murphy WJ. Adoptive cellular immunotherapy: NK cells and bone marrow transplantation. *Histol Histopathol* 2000;15:1201–10.
- [3] Lundqvist A, McCoy JP, Samsel L, Childs R. Reduction of GVHD and enhanced antitumor effects after adoptive infusion of alloreactive Ly49-mismatched NK cells from MHC-matched donors. *Blood* 2007;109:3603–6.
- [4] Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Capanni M, Carotti A, Aloisi T, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097–100.
- [5] Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol* 2004;172:644–50.
- [6] Pérez-Martínez A, Leung W, Muñoz E, Iyengar R, Ramírez M, Vicario JL, et al. KIR-HLA receptor-ligand mismatch associated with a graft-versus-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric metastatic solid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53: 120–4.
- [7] Pérez-Martínez A, de Prada Vicente I, Fernández L, González-Vicent M, Valentin J, Martín R, et al. Natural killer cells can exert a graft-vs-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric solid tumors. *Exp Hematol* 2012;40:882–91.
- [8] Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A, McNeareney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005;105: 3051–7.
- [9] Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, et al. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010;28:955–9.
- [10] Geller MA, Cooley S, Judson PL, Ghebre R, Carson LF, Argenta PA, et al. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy* 2011;13:98–107.
- [11] Waldmann TA. Interleukin-15 in the treatment of cancer. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10:1689–701.
- [12] Conlon KC, Lugli E, Welles HC, Rosenberg SA, Fojo AT, Morris JC, et al. Redistribution, Hyperproliferation, Activation of Natural Killer Cells and CD8 T Cells, and Cytokine Production During First-in-Human Clinical Trial of Recombinant Human Interleukin-15 in Patients With Cancer. *J Clin Oncol* 2015;33:74–82.
- [13] Schlegel P, Teltschik HM, Pfeiffer M, Handgretinger R, Schumm M, Koscielniak E, et al. Long-term IL-2 therapy after transplantation of T cell depleted stem cells from alternative donors in children. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011;24:443–52.
- [14] Alpdogan O, Eng JM, Muriglan SJ, Willis LM, Hubbard VM, Tjoe KH, et al. Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2005;105:865–73.
- [15] Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhang J, Tian Z. Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine* 2008;42: 128–36.
- [16] Koehl U, Sörensen J, Esser R, Zimmermann S, Grütner HP, Tonn T, et al. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33:261–6.
- [17] Stern M, Passweg JR, Meyer-Monard S, Esser R, Tonn T, Soerensen J, et al. Pre-emptive immunotherapy with purified natural killer cells after haploidentical SCT: a prospective phase II study in two centers. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:433–8.
- [18] Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity and haploidentical Hematopoietic transplantation. *Cytotherapy* 2006; 8:554–8.
- [19] Iyengar R, Handgretinger R, Babarin-Dorner A, Leimig T, Otto M, Geiger TL, et al. Purification of human natural killer cells using a clinical-scale immunomagnetic method. *Cytotherapy* 2003;5:479–84.
- [20] Pfeiffer MM, Schumm M, Müller I, Handgretinger R, Lang P. IL-15-stimulated CD3/CD19-depleted stem-cell boosts in relapsed pediatric patients after haploidentical SCT. *Leukemia* 2012;26:2435–9.
- [21] Ladenstein R, Pötschger U, Le Deley MC, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, et al. Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J Clin Oncol* 2010;28:3284–91.
- [22] Ahn YO, Weigel B, Verneris MR. Killing the killer: natural killer cells to treat Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16:3819–21.
- [23] Cho D, Shook DR, Shimasaki N, Chang YH, Fujisaki H, Campana D. Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin Cancer Res* 2010;16: 3901–9.
- [24] Sevilla J, González-Vicent M, Madero L, García-Sánchez F, Diaz MA. Granulocyte colony-stimulating factor alone at 12 microg/kg twice a day for 4 days for peripheral blood progenitor cell priming in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 2002;30:417–20.
- [25] Pérez-Martínez A, González-Vicent M, Valentin J, Aleo E, Lassaletta A, Sevilla J, et al. Early evaluation of immune reconstitution following allogeneic CD3/CD19-depleted grafts from alternative donors in childhood acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:1419–27.
- [26] Fernández L, Portugal R, Valentin J, Martín R, Maxwell H, González-Vicent M, et al. In vitro natural killer cell immunotherapy for medulloblastoma. *Front Oncol* 2013;3:94.
- [27] Martin AM, Kulski JK, Gaudieri S, Witt CS, Freitas EM, Trowsdale J, et al. Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene* 2004; 335:121–31.
- [28] Blomberg K, Granberg C, Hemmälä I, Lövgren T. Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. I. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. *J Immunol Methods* 1986;86: 225–9.
- [29] Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cells as a therapeutic tool in mismatched transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004;17:427–38.
- [30] Novitzky N, Davison GM, Hale G, Waldmann H. Immune reconstitution at 6 months following T-cell depleted hematopoietic stem cell transplantation is predictive for treatment outcome. *Transplantation* 2002;74:1551–9.
- [31] Munker R, Schmid C, Madrigal JA, Kolb HJ. An update on graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactions: a summary of the sixth International Symposium held in


- Schloss Ellmau, Germany, January 22–24, 2004. Bone Marrow Transplant 2004;34:767–80.
- [32] Storb R, Gyurkocza B, Storer BE, Sorror ML, Blume K, Niederwieser D, et al. Graft-versus-host disease and graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation. J Clin Oncol 2013;31:1530–8.
- [33] Shah NN, Baird K, Delbrook CP, Fleisher TA, Kohler ME, Rampertaap S, et al. Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following T-cell-depleted stem cell transplantation. Blood 2015;125:784–92.
- [34] Buddingh EP, Schilham MW, Ruslan SE, Berghuis D, Szuhai K, Suurmond J, et al. Chemotherapy-resistant osteosarcoma is highly susceptible to IL-15-activated allogeneic and autologous NK cells. Cancer Immunol Immunother 2011;60:575–86.
- [35] Tang F, Zhao LT, Jiang Y, Ba de N, Cui LX, He W. Activity of recombinant human interleukin-15 against tumor recurrence and metastasis in mice. Cell Mol Immunol 2008;5:189–96.
- [36] Yang Q, Goding SR, Hokland ME, Basse PH. Antitumor activity of NK cells. Immunol Res 2006;36:13–25.
- [37] Chiossone L, Vitale C, Cottalasso F, Moretti S, Azzarone B, Moretta L, et al. Molecular analysis of the methylprednisolone-mediated inhibition of NK-cell function: evidence for different susceptibility of IL-2- versus IL-15-activated NK cells. Blood 2007;109:3767–75.
- [38] Pfeiffer MM, Feuchtinger T, Teltschik HM, Schumm M, Müller I, Handgretinger R, et al. Reconstitution of natural killer cell receptors influences natural killer activity and relapse rate after haploidentical transplantation of T- and B-cell depleted grafts in children. Haematologica 2010;95:1381–8.
- [39] Schlegel P, Feuchtinger T, Nitschke-Gérard C, Eva Seidel UJ, Lang AM, Kyzirakos C, et al. Favorable NK cell activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in stage IV relapsed Ewing's sarcoma patients. Bone Marrow Transplant 2015;(50 Suppl 2):S72–6.
- [40] Wai LE, Fujiki M, Takeda S, Martinez OM, Krams SM. Rapamycin, but not cyclosporine or FK506, alters natural killer cell function. Transplantation 2008;85:145–9.
- [41] Wang H, Grzywacz B, Sukovich D, McCullar V, Cao Q, Lee AB, et al. The unexpected effect of cyclosporin A on CD56+CD16 and CD56+CD16+ natural killer cell subpopulations. Blood 2007;110:1530–9.
- [42] Petersson E, Qi Z, Ekberg H, Ostraat O, Dohlsten M, Hedlund G. Activation of alloreactive natural killer cells is resistant to cyclosporine. Transplantation 1997;63:1138–44.
- IL-15 NK cells after haplo-SCT for solid tumors* 1603
- [43] Eissens DN, Van Der Meer A, Van Cranenbroek B, Preijers FW, Joosten I. Rapamycin and MPA, but not CsA, impair human NK cell cytotoxicity due to differential effects on NK cell phenotype. Am J Transplant 2010;10:1981–90.
- [44] Shao-Hsien C, Lang I, Gunn H, Lydyard P. Effect of in vitro cyclosporin. A treatment on human natural and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Transplantation 1983;35:127–9.
- [45] Introna M, Allavena P, Spreafico F, Mantovani A. Inhibition of human natural killer activity by cyclosporin A. Transplantation 1981;31:113–6.
- [46] Morteau O, Blundell S, Chakera A, Bennett S, Christou CM, Mason PD, et al. Renal transplant immunosuppression impairs natural killer cell function in vitro and in vivo. PLoS One 2010;5:e13294.
- [47] Wasik M, Gorski A, Stepień-Sopniewska B, Lagodzinski Z. Effect of FK506 versus cyclosporine on human natural and antibody-dependent cytotoxicity reactions in vitro. Transplantation 1991;51:268–70.
- [48] Meehan AC, Mifsud NA, Nguyen TH, Levvey BJ, Snell GI, Kotsimbos TC, et al. Impact of commonly used transplant immunosuppressive drugs on human NK cell function is dependent upon stimulation condition. PLoS One 2013;8:e60144.
- [49] Ohata K, Espinoza JL, Lu X, Kondo Y, Nakao S. Mycophenolic acid inhibits natural killer cell proliferation and cytotoxic function: a possible disadvantage of including mycophenolate mofetil in the graft-versus-host disease prophylaxis regimen. Biol Blood Marrow Transplant 2011;17:205–13.
- [50] De Maria A, Fogli M, Costa P, Murdaca G, Puppo F, Mavilio D, et al. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKP46, NKP30 and NKP44). Eur J Immunol 2003;33:2410–8.
- [51] Lowe EJ, Turner V, Handgretinger R, Horwitz EM, Benaim E, Hale GA, et al. T-cell alloreactivity dominates natural killer cell alloreactivity in minimally T-cell-depleted HLA-non-identical pediatric bone marrow transplantation. Br J Haematol 2003;123:323–6.

Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.07.011>.

BRIEF REPORT

How do we manufacture clinical-grade interleukin-15–stimulated natural killer cell products for cancer treatment?

Lucía Fernández,¹ Alejandra Leivas,² Jaime Valentín,³ Adela Escudero,⁴ Dolores Corral,⁵ Raquel de Paz,⁶ María Vela,³ David Bueno,⁷ Rebeca Rodríguez,⁸ Juan Manuel Torres,⁸ Mariana Díaz-Almirón,⁹ Eduardo López-Collazo,³ Joaquín Martínez-López ², and Antonio Pérez-Martínez⁷

BACKGROUND: Cancer immunotherapy involving natural killer (NK) cells has gained interest. Here we report two methods to obtain interleukin (IL)-15–activated NK cells for clinical use.

STUDY DESIGN AND METHODS: IL-15–activated NK cell products were obtained after 1) enrichment from healthy haploidentical donors' peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected by nonmobilized apheresis by a two-step magnetic procedure, depletion of CD3+ cells followed by selection of CD56+ cells and ex vivo overnight stimulation with IL-15 (NKIL15); and 2) expansion using the K562-mb15-41BBL cell line (NKA), from autologous PBMCs from patients with multiple myeloma or expansion from healthy haploidentical PBMCs obtained from whole blood using the same previous cell line. We analyzed the NK cell recovery and expansion, T cell depletion, phenotype, cytotoxicity, safety, and genomic stability of two good manufacturing practices (GMP)–grade IL-15–activated NK cell products.

RESULTS: The number of NK cells obtained from NKIL15 cell and NKA cell products was similar; however, there were significantly fewer T cells in the NKIL15 cell product. The haploidentical NKA cell product contained more T cells than the autologous NKA cell product. The surface expression of the activating receptors CD69, CD25, natural killer group-2 member D receptor, NKp44, NKp46, NKp30, and DNA accessory molecule 1 was up regulated in both NK cell products. NKIL15 cell and NKA cell products had significantly higher lytic activity than unstimulated NK cells and showed no lytic activity against PBMCs from healthy donors. No genetic alterations or potential oncogenic effects were found.

CONCLUSION: Different GMP-grade procedures can be used to obtain large numbers of highly IL-15–activated NK cells with extremely low T cell content for clinical use.

Natural killer (NK) cells are able to recognize and kill virally infected or transformed cells in a short time and without prior sensitization,¹ representing a promising therapeutic option

ABBREVIATIONS: DNAM-1 = DNA accessory molecule 1; E:T ratio = effector:target; FCM = flow cytometry; GMP = good manufacturing practice; MM = multiple myeloma; NKA cell(s) = activated and expanded natural killer cell(s); NK2D = natural killer group-2 member D receptor; NKIL15 cell(s) = overnight interleukin-15–stimulated natural killer cell(s); NKT cell(s) = natural killer T cell(s).

From the ¹Clinical Research Department, Spanish National Cancer Research Center, CNIO; the ²Hematology Department, University Hospital 12 de Octubre; the ³Tumor Immunology Lab, IdiPAZ; the ⁴Medical and Molecular Genetics Institute, INGEMM; the ⁵Pediatric Department, Autonomous University of Madrid; and the ⁶Hematology Department, the ⁷Pediatric Hemato-Oncology, the ⁸Immunology Department; and the ⁹Biostatistics Department, La Paz University Hospital, Madrid, Spain.

Address reprint requests to: Joaquín Martínez-López, Hematology Department, University Hospital 12 de Octubre; Avenida de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain; e-mail: jmarti01@ucm.es; and Antonio Pérez-Martínez, Pediatric Hemato-Oncology, La Paz University Hospital; Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain; e-mail: aperezmartinez@salud.madrid.org

LF and AL are equal contributors.

This work was supported in part by the National Health Service of Spain, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), a FONDOS FEDER grant (FIS) PI15/00973, Asociación Española Contra el Cáncer to APM, and a CRIS Foundation to Beat Cancer grant to LF and JV.

Received for publication October 31, 2017; revision received January 16, 2018; and accepted January 29, 2018.

doi:10.1111/trf.14573

© 2018 AABB

TRANSFUSION 2018;00:00–00

for patients with various malignancies; however, the use of NK cells as an immunotherapeutic approach to treating cancer patients presents some limitations: 1) NK cells represent only a minor fraction of human lymphocytes, and large numbers are needed to achieve clinical benefits, and 2) they need to be fully activated to induce the NK cell-mediated killing of tumor cells. These limitations can only be overcome by the development of good manufacturing practice (GMP)-compliant methods for the production of sufficient highly activated NK cells for clinical use. Several protocols for activation and ex vivo NK cell expansion have been investigated, including overnight or long-term culture with various cytokines,²⁻⁵ and the use of various sources of irradiated feeder cells.^{6,7}

The aim of this study was to describe two different GMP-compliant methods to obtain interleukin (IL)-15-activated NK cells from healthy donors and from high-risk patients with multiple myeloma (MM) for clinical use. In the first method, NK cells from healthy donors were purified from leukapheresis products by immunomagnetic procedures, and soluble IL-15 was used for overnight ex vivo stimulation (NKIL15). In the second method, starting with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from either healthy donors or patients with MM, activated and expanded NK cells (NKAE cells; as previously reported)⁷ were obtained by coculture with the K562mbIL15-41BBL cell line, which implies IL-15 ex vivo transpresentation. The NK cell products described in this report have been successfully infused into patients in four different clinical trials.

MATERIALS AND METHODS

NK cell source

We obtained a total of 58 activated NK cell products. From 26 different healthy donors we obtained 1) haploidentical ex vivo IL-15 overnight-stimulated NK cells ($n = 8$) and 2) haploidentical NKAE cells ($n = 32$). From five patients suffering from high-risk myeloma we obtained autologous NKAE cells ($n = 18$). NK cell products were used in four different clinical trials: haploidentical NKIL15 cells (EudraCT 2009-010186-23), haploidentical NKAE cells (EudraCT 2012-000054-63 and EudraCT 2012-005146-38), and autologous NKAE cells (EudraCT 2012-000514-11). All study samples were obtained after acquisition of the study participants' written informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki. The research protocol was reviewed and approved by the institutional review board of Niño Jesús Hospital, 12 de Octubre University Hospital, and La Paz University Hospital (Permit H-1004-027-315).

NK cell isolation and stimulation

IL-15 overnight-stimulated NK cells

The ex vivo immunomagnetic purification procedure comprised CD3 depletion followed by CD56 cell selection

as previously described.⁸ In summary, to deplete CD3+ T cells, CD3 reagent (CliniMACS, Miltenyi Biotec, 273-01) and the "DEPLETION 2.1" program in CliniMACS instrument (Miltenyi Biotec) were used. The CD56+CD3- NK cells were enriched by using clinical-grade CD56 microbeads (Miltenyi Biotec, 194-01) and the program "ENRICHMENT1.1" in CliniMACS device. Fresh and highly purified NK cells were then incubated ex vivo with 10 ng/mL of IL-15 (GMP recombinant rh IL-15; CellGenix, 1013-050) overnight (Fig. 1A). GMP was observed throughout all the process. At every step, the live cells were counted using Trypan blue solution (Sigma, T8154-20ML) and a Neubauer improved cell counting chamber (Sigma, BR717805-1EA). The percentages and absolute numbers of viable NK and T cells were analyzed by means of flow cytometry. Immediately after purification and after overnight ex vivo IL-15 stimulation the NK cells were analyzed for phenotypic markers and cytotoxicity against K562, U266, Jurkat, and A673 cell lines.

NKAE cells

The GMP genetically modified K562mbIL15-41BBL cell line was provided by D. Campana, National University of Singapore, and irradiated with 100 Gy. Human PBMCs were obtained from the peripheral blood of haploidentical donors or from patients with MM at the Niño Jesús Hospital GMP facility by centrifugation over Ficoll (GE Healthcare Bio-Sciences, 17-5442-02) at $400 \times g$ for 30 minutes and washed once with phosphate-buffered saline (Gibco, 10010-023), 0.5% human serum albumin, and EDTA. To expand the population of CD56+CD3- NK cells, we cocultured the PBMCs with K562mbIL15-41BBL cells at a 1.5:1 ratio for 2 weeks in RPMI-GlutaMax (Gibco, Life Technologies, 618700-010) supplemented with 10% human AB serum (Sigma, H4522) and 100 IU/mL GMP IL-2 (Miltenyi, 130-076-147). Fresh medium was added every 2 days to a final concentration of 1×10^6 cells/mL (Fig. 1B). Regularly, the live cells were counted using Trypan blue solution (Sigma, T8154-20ML) and a Neubauer-improved cell counting chamber (Sigma, BR717805-1EA). Percentage and phenotype of NK cells, T cells, and natural killer T (NKT) cells were monitored every week by flow cytometry (FCM). Fourteen days after the beginning of the expansion, cytotoxicity of NKAE cells was analyzed using K562 or U266 cell lines as targets.

Antibodies and FCM analysis

Cultures were tested after leukapheresis, after each depletion and selection, and every week during stimulation to monitor NK cell purity, phenotype, residual T cells, and viability. The antibodies are summarized in Table S1 (available as supporting information in the online version of this paper). FCM was performed on a flow cytometer (FACSCanto II, BD Biosciences). The mean fluorescence

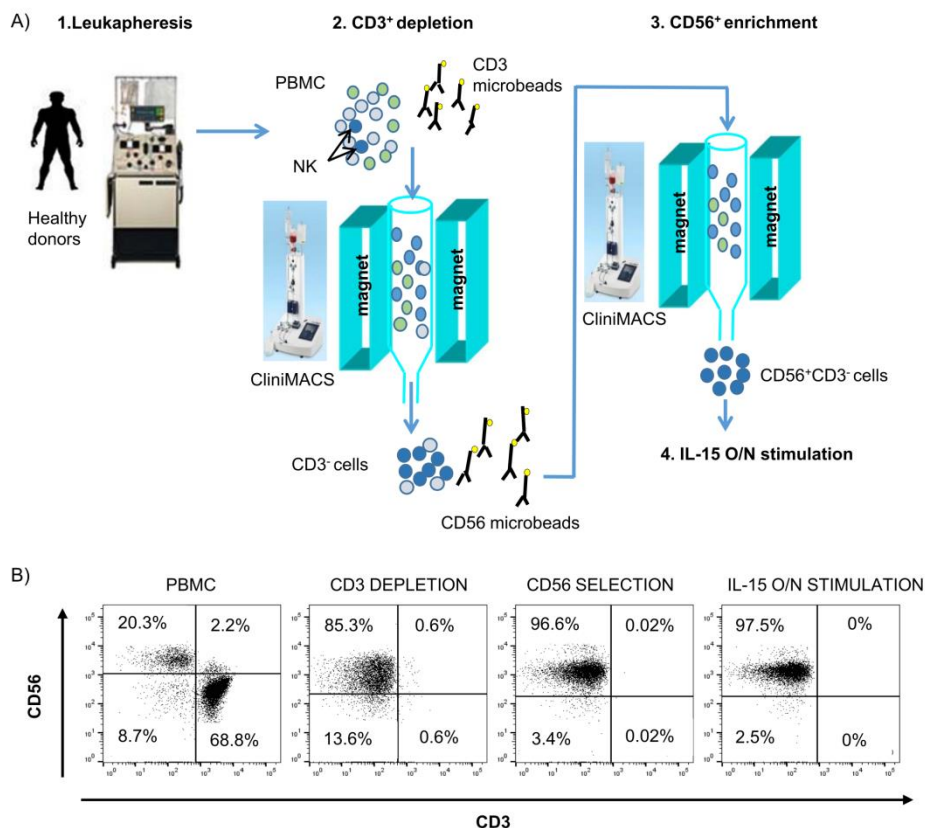


Fig. 1. Production of NKIL15 cells. (A) Schematic representation of the various steps in NKIL15 cell production. After leukapheresis, CD3⁺ cells are depleted by an immunomagnetic procedure using CD3 microbeads and a CliniMACS device. The CD3-depleted fraction is then labeled with CD56 microbeads for CD56⁺ cell selection using a CliniMACS device. Isolated NK cells are then stimulated with IL-15 overnight. (B) Representative FCM data on NK cell purification along the various steps.

intensity (MFI) ratio was defined as the MFI of the specific staining relative to the MFI of the appropriate isotype control staining. Absolute cell counts were measured with a single-platform approach using fluorospheres (Flow Count, Beckman Coulter). The NK and T cells were gated, as previously reported.⁹ Computer software (FlowJo vX.0.7, TreeStar) was used for the data analysis.

Cytotoxicity assays

The cytolytic activity of the NK cell products was evaluated against the K562, U266 cell lines, and PBMNCs from healthy donors at 8:1, 4:1, 2:1, and 1:1 effector:target (E:T) ratios by

performing conventional 2-hour europium-TDA release assays (Perkin Elmer; AD0116), as described previously.¹⁰

Release test

Microbiologic test

The NK cell products were tested for sterility according to European Pharmacopeia 2.6.1. Mycoplasma contamination was analyzed using a classic mycoplasma polymerase chain reaction (PCR) detection kit (VenorGeM, Sigma Aldrich, MP0025) and 1.5% standard agarose gel. Gram staining was performed by using (the Color Gram 2 test from bioMérieux (412541)).

TABLE 1. Characteristics of the NKIL15 and NKAIE cell products at the different steps				
NKIL15 cell products		NKAIE cell products		NKIL15 cells vs. allogeneic NKAIE cells
Cell product (n = 8)	Mean ± SD	Autologous (n = 18), mean ± SD	Allogeneic (n = 32), mean ± SD	
Leukapheresis product				
Day 0				
WBCs (×10 ⁶)	22291.75 ± 17311.64	346.83 ± 121.14	131.22 ± 63.71	p values NKIL15 cells/NKAIE cells
NK cells (%)	8.25 ± 4.48	17.33 ± 8.57	9.14 ± 3.56	4.55677 × 10 ⁻⁹
NK cells (×10 ⁶)	2124.35 ± 2292.69	22.39 ± 16.56	12.74 ± 8.78	0.556021757
T cells (%)	56.2 ± 4.42	55.03 ± 14.49	55.85 ± 17.57	4.92184 × 10 ⁻⁶
T cells (×10 ⁶)	12914.41 ± 10806.9	67.7 ± 47.45	72.48 ± 35.19	0.956759818
NKT (%)	—	2.96 ± 8.07	3.47 ± 3.13	3.98504 × 10 ⁻⁸
NKT cells (×10 ⁶)	—	1.48 ± 2.31	4.22 ± 3.95	—
Viability (%)	98.1 ± 1.9	85.17 ± 29.16	94.58 ± 9.57	0.714640069
After CD3 depletion				
Day 7				
WBCs (×10 ⁶)	6582.5 ± 3664.91	558.11 ± 380.49	389.78 ± 213.35	
NK cells (%)	27.57 ± 13.1	69.61 ± 18.37	60.42 ± 17.14	
NK cells (×10 ⁶)	2142.91 ± 1966.87	296.91 ± 233.36	230.28 ± 151.90	
T cells (%)	0.2 ± 0.27	10.41 ± 7.59	21.27 ± 12.81	
T cells (×10 ⁶)	12.1 ± 15.21	45.98 ± 56.65	91.96 ± 77.15	
NKT cells (%)	—	2.09 ± 3.21	4.72 ± 4.62	
NKT cells (×10 ⁶)	—	12.66 ± 30.09	19.79 ± 27.07	
Viability (%)	99.75 ± 0.25	71.56 ± 29.67	65.68 ± 18.26	
After CD56 enrichment				
Day 14				
WBCs (×10 ⁶)	1148.75 ± 1159.35	752.11 ± 316.02	639.78 ± 435.81	
NK cells (%)	93.64 ± 8.33	91.29 ± 5.85	79.93 ± 17.43	
NK cells (×10 ⁶)	1113 ± 1164.49	584.74 ± 306.06	515.23 ± 345.03	
T cells (%)	0.025 ± 0.07	3.36 ± 2.76	9.71 ± 8.28	
T cells (×10 ⁶)	0.13 ± 0.37	17.15 ± 15.71	52.66 ± 42.88	
NKT cells (%)	—	1.82 ± 2.54	7.46 ± 12.76	
NKT cells (×10 ⁶)	—	9.50 ± 13.32	51.67 ± 103.41	
Viability (%)	99.36 ± 0.78	79.89 ± 23.94	73.99 ± 19.65	
After overnight IL15 stimulation				
				p values NKIL15 cells/NKAIE cells
WBCs (×10 ⁶)	529.75 ± 563.79			0.550460897
NK cells (%)	95.4 ± 3.5			0.017959894
NK cells (×10 ⁶)	513.51 ± 550.3			0.991164031
T cells (%)	0			0.002186967
T cells (×10 ⁶)	0			0.00108708
Viability (%)	92.65 ± 14.65			0.063756019

Genetic stability test

On Days 14 and 21 of coculture, the absence of residual K562-mb15-41BBL tumoral cell line was verified by performing a real-time PCR (RT-PCR) for Mbc transcript as previously described.¹¹ To check the lack of oncogenic effects of the NKAIE cell products, RT-PCR to detect c-MYC and telomerase (TERT) expression was performed on Days 14 and 21 as described.¹¹⁻¹³ Additionally, array comparative genomic hybridization (CGH) was performed to rule out chromosomal aberrations in the genomic DNA of NKIL15 and NKAIE cell final products. DNA was isolated from cell cultures using the DNA/RNA micro kit (AllPrep, Qiagen, 80284) and were hybridized with male reference DNA (Promega Biotech, G1471) on a (60,000 oligonucleotide CGH-SNP platform from Agilent (G4885A)).

Statistical analysis

All the data were analyzed at the Statistics Department of Hospital Universitario La Paz. Results are shown as

mean ± standard deviation (SD). Nonparametric Wilcoxon tests were used to compare expansion kinetics and cytotoxicity. Significance was defined as $p \leq 0.05$. The statistical analyses were performed with computer software (SPSS, Version 11.0, SPSS, Inc.).

RESULTS

Total cell numbers, NK cell purity, and viability

NK cell immunomagnetic purification from healthy donors' apheresis and IL-15 overnight activation

A total of eight nonmobilized apheresis products from healthy donors were first immunomagnetically T cell depleted. A schema of the different steps for NKIL15 cell production and representative FCM data of the NK cell purity along the process are shown in Fig. 1. The numerical data regarding percentages and total numbers of white blood cells (WBCs), NK cells, and T cells and viability at the different steps are summarized in Table 1. NKIL15 cell products were infused into six pediatric patients suffering

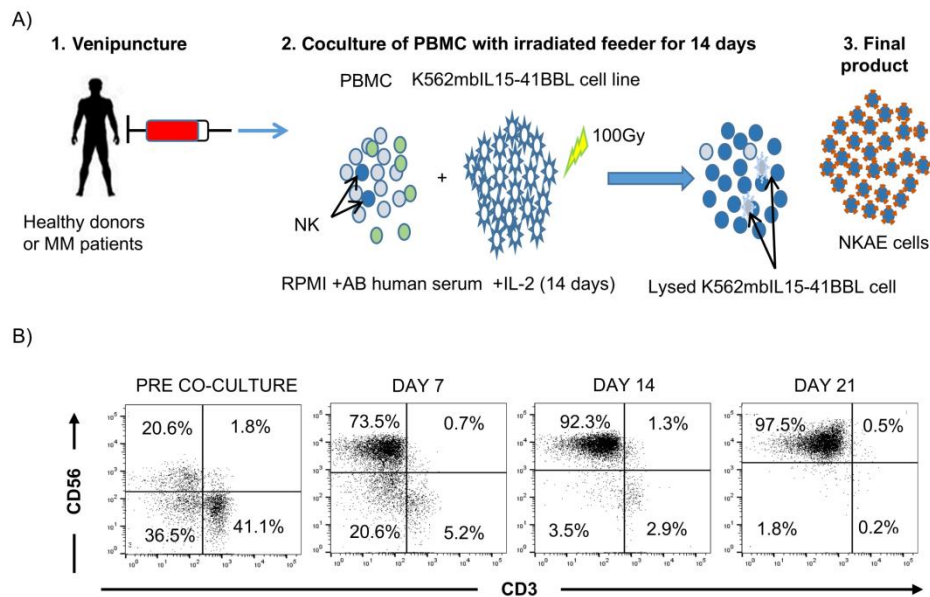


Fig. 2. Production of NKAE cell products. (A) Schematic representation of NKAE cell production. After venipuncture, PBMCs are obtained by centrifugation over Ficoll. PBMCs are then cocultured with K562mbIL15-41BBL cells (irradiated with 100 Gy) for 14 days. (B) Representative FCM data on NK cell purification during the coculture of the NKAE cells.

from different refractory solid tumors (EudraCT 2009-010186-23).⁵

Expansion and activation of NK cells from healthy haploidentical PBMCs with the K562mb-IL15-41BBL cell line

A total of 32 PBMC products with a volume of 250 mL each were obtained from healthy donors. A schematic representation of the different steps for NKAE cell production and representative FCM data of the NK cell purity along the process are shown in Fig. 2. Percentages; total WBCs, NK cells, NKT cells, and T cells; and viability at the different steps are summarized in Table 2. Haploidentical NKAE cell products were infused into seven patients suffering from T cell acute lymphoblastic leukemia (EudraCT 2012-000054-63) and into 13 patients suffering from acute leukemia (EudraCT 2012-005146-38, data pending publication). Haploidentical NKAE cell products contained residual T cells and NKT cells (Table 1).

Expansion and activation of NK cells from MM patients' PBMCs with K562mb-IL15-41BBL cell line

A total of 18 PBMCs products with a volume of 200 mL each were obtained from patients with MM. Data relative

to total WBCs, NK cells, NKT cells, and T cells are summarized in Table 2. The mean expansion of CD56⁺CD3⁻ cells after 7 days of culture was 34.64 ± 57.74 -fold and the expansion of CD3⁺ T cells was minimal (1.54 ± 4.00). Autologous NKAE cell products were infused into five patients suffering from MM (EudraCT 2012-000514-11).

Phenotype of NKIL15 and NKAE cell products

We next evaluated the phenotype changes associated with overnight IL-15 stimulation and ex vivo activation and expansion with K562-mb15-41BBL cell line. Overnight, NKIL15 and NKAE cells were analyzed by FCM at baseline and on Day 14 after ex vivo expansion. We found that the surface expression of the activating receptors CD69, CD25, Nkp44, Nkp46, Nkp30, NK group-2 member D receptor (NKG2D), and DNA accessory molecule 1 (DNAM-1) was up regulated both in the NKIL15 and in the NKAE cells (from donors and from patients) when compared with resting NK cells. Haploidentical NKAE cell products showed higher expression levels of these activation receptors when compared to NKIL15 cell products (Table 3). For the autologous NKAE cells from the patients with MM, the percentage of expression of the activating

TABLE 2. Phenotype of GMP-grade NK cell products*

Autologous	Allogeneic									
	Resting					p value				
	NK cells vs. NKAE cells					Resting NK cells vs. NKIL15 cells				
	Resting NK cells	NKAE cells	Resting NK cells vs. NKAE cells	Resting NK cells	NKAE cells	Resting NK cells vs. NKAE cells	Resting NK cells vs. NKIL15 cells	Final NKIL15 cells vs. NKAE	Resting NK cells auto vs. allo	Final NKAE cells auto vs. allo
Receptor expression										
CD69	15.70 ± 12.78	51.9 ± 38.75	0.13	21.54 ± 13.97	87.96 ± 12.79	64.40 ± 5.92	0.0008	0.01	0.54	0.08
CD25	8.77 ± 6.43	18.00 ± 10.00	0.17	10.43 ± 7.56	56.17 ± 13.59	21.48 ± 6.52	0.0002	0.002	0.74	0.002
NKG2D	32.40 ± 14.48	75.33 ± 35.05	0.06	83.37 ± 5.66	92.49 ± 7.11	90.30 ± 7.60	0.05	0.66	0.0002	0.31
DNAM-1	72.5 ± 6.25	90.20 ± 7.65	0.01	71.18 ± 17.05	85.48 ± 9.54	79.25 ± 4.90	0.14	0.28	0.89	0.45
NKp44	16.15 ± 12.22	37.03 ± 34.96	0.3	30.37 ± 12.96	50.73 ± 10.56	64.85 ± 7.64	0.03	0.06	0.14	0.43
NKp46	29.08 ± 21.12	73.5 ± 19.42	0.77	47.99 ± 6.21	82.28 ± 12.51	80.00 ± 8.02	0.0006	0.76	0.07	0.44
NKp30	55.18 ± 22.23	84.6 ± 10.83	0.05	49.61 ± 11.90	75.47 ± 14.68	84.10 ± 4.78	0.001	0.30	0.64	0.34

* In autologous NK cell products from MM patients, expression of activating receptors is higher 14 days after expansion compared to resting NK cells. In allogeneic NK cell products, expression of activating receptors increases in both NKIL15 and NKAE cells compared to resting cells.

receptors CD69, CD25, NKG2D, NKp44, NKp46, NKp30, and DNAM-1 was higher than in the resting NK cells; however, this difference was significant only for DNAM-1 (p = 0.01) and NKp30 (p = 0.05; Table 3). Representative FCM data on NK cell receptor expression in resting NK, NKIL15, and NKAE cells from healthy donors are shown in Fig. S1 (available as supporting information in the online version of this paper).

Cytotoxic function of NKIL15 and NKAE cell products

We next evaluated the cytolytic activity of resting NK, NKIL15, and NKAE cells from healthy donors against the K562 cell line. Both the NKIL15 cells and the NKAE cells showed significantly higher lytic activity when compared with the resting NK cells for E:T ratio of 8:1 (p = 0.025 and p = 0.00026, respectively). In addition, the NKAE cells showed significantly higher cytotoxicity than the NKIL15 cells for E:T ratio of 8:1 (p = 0.001, p = 0.04, p = 0.00096, p = 0.0024, respectively; Fig. 3A). The cytotoxicity of NKAE cells from patients with MM was tested against the MM cell line U266. The NKAE cells from patients with MM showed significantly higher lysis capacity against U266 cells when compared with resting NK cells (p = 0.001, p = 0.004, and p = 0.004 for ratios of 8:1, 4:1, and 2:1, respectively; Fig. 3B). Neither the NKIL15 nor the NKAE cell products showed lytic activity against PBMCs from healthy donors (data not shown).

Release test

In NKAE cell products, Mbc expression was undetectable after the first week of culture. Furthermore, the NKAE and NKIL15 cell products showed no alteration in c-MYC and TERT expression when compared with the starting cell population (PBMCs; Fig. S2, available as supporting information in the online version of this paper). We did not find chromosomal aberrations in the NKIL15 and NKAE cells from healthy donors analyzed by array-CGH. No microbiologic contamination was observed in any of the NK cell products (data not shown).

DISCUSSION

Different GMP-compliant protocols for clinical-grade NK cell enrichment and culture have been reported; however, no standard procedure has been established. In this study we described two different protocols to obtain highly purified NKIL15 cell products that have been successfully used in the clinical setting. Haploidentical NK cells were manufactured by T cell depletion followed by NK cell selection and IL-15 overnight stimulation. Haploidentical and autologous NKAE cell products were manufactured by NK cell purification and activation after coculture of PBMCs with K562mbIL15-41BBL cells.

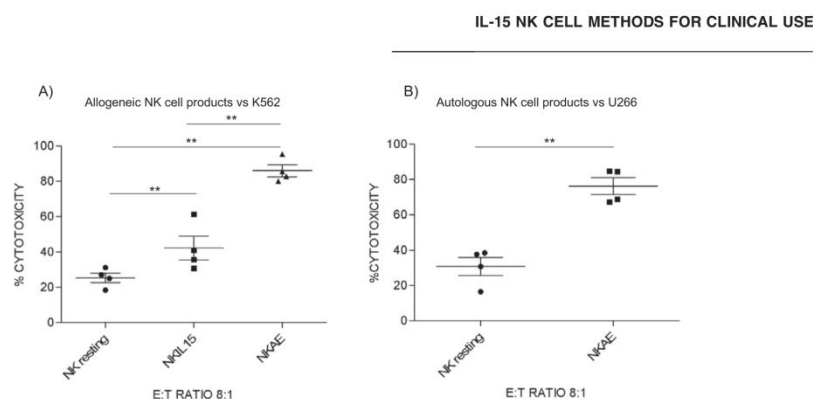


Fig. 3. Cytotoxic activity of NK cell products. (A) Allogeneic NK cell products. At 8:1 E:T ratio, NKIL15 and NKAE cells products show higher cytolytic activity than resting NK cells against K562 cell line. NKAE cell products exhibit an increased lytic activity when compared to NKIL15 products. $**p \leq 0.01$. (B) Autologous NKAE cell products from MM patients show significantly higher lytic capacity against U266 MM cell line when compared to resting NK cells ($p = 0.001$). $n = 4$ is shown for each group.

Activation of NK cells from healthy donors by NK cell selection and IL-15 overnight stimulation achieved highest NK cell purity. Our data are similar to those obtained by Koehl and colleagues⁸ using the same depletion and enrichment protocol in CliniMACS system. However, our protocol includes an additional IL-15 overnight ex vivo stimulation step. After this additional step, we obtained a total T and NKT cell depletion, although NK cell recovery is also slightly impaired. For this reason, this should be the method used in the transplant setting, to minimize the risk of inducing graft-versus-host disease (GVHD).

Haploidentical NKAE cell products obtained by expansion and activation of PBMC from healthy donors with the K562mb-IL15-41BBL cell line, contained residual T cells and NKT cells, indicating that this protocol might not be optimal in the transplant setting. In fact, donor-derived IL-15-41BBL-activated NK cells as donor lymphocyte infusions have been reported to contribute to induced GVHD in match-related peripheral blood transplantation.¹⁴ However, no cases of GVHD associated with allogeneic NKAE cell infusions were reported in our clinical trials EudraCT2012-000054-63 or EudraCT2012-005146-38 (data pending publication). Additionally, infusion of ex vivo NKIL15 cells appeared to be safe even in a mismatched allogeneic setting.⁵ Expansion of NK cells by this approach requires a minimum of 14 to 21 days to obtain high numbers of NKAE cells. Another potential disadvantage of this NK cell expansion method is replicative senescence due to telomere shortening, which could impair NK cells' ability to expand in vivo once they are infused and genomic instability induced by high doses of IL-15.¹⁵ Despite the fact that we did not check telomere length, we found genetic stability in our NK cell product. One way to circumvent this obstacle could be the use of

the K562mbIL21-41BBL-modified cell line to stimulate and expand NK cells. It has been reported that ex vivo NK cell expansion with this cell line achieves high fold expansion (more than 47,000-fold in 21 days) while maintaining telomere length.^{6,16,17} Clinical trials are ongoing to test the safety and efficacy of NK cells expanded by this method; however, there are no available data yet.

Both strategies increased the expression of activation receptors that are important for tumor cell recognition, including NKG2D, DNAM-1, NKP30, NKP44, and NKP46, when compared with resting NK cells. However, the expansion with the K562mbIL15-41BBL cells achieved a higher up regulation of these receptors in patients and healthy donor's NKAE cells. Furthermore, NKAE cell products showed the highest cytotoxicity. These data agreed with previous reports regarding in vivo NKAE cell cytotoxicity against solid tumors.^{18,19}

NK cells represent a promising therapeutic option for patients with various malignancies. Therefore, it is of great interest to explore novel GMP-compliant manufacturing methods to obtain activated NK cells for clinical use. The NK cell products described in this report have been successfully infused into patients in four different clinical trials, representing a step forward in the advancement of scientific research in this field.

In summary, we show here two different methods to obtain large numbers of activated and cytotoxic NK cells for clinical use. The advantages of NK cell expansion are the ability to infuse cells at various times during the expansion, higher activation of NK cells as shown by the expression of activation markers, and higher cytotoxic activity of the NK cells. Disadvantages are the time needed for the expansion, the T cell contamination, and a potentially limited in vivo proliferation after infusion. Advantages from

ex vivo overnight IL-15 stimulation of NK cells are the speed of the procedure, NK cell purity, and the ease of combining with different approaches. The disadvantages are that only one infusion can be performed once and the need for in vivo expansion for cells to be active.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sandra Santamaría for the NK cell production and Gustavo Melen for the GMP protocol supervision. We thank María de Miguel Gallo for editorial support.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest.

REFERENCES

- Geller M, Miller JS. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 2011;3:1445-59.
- Cella M, Otero K, Colonna M. Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1beta reveals intrinsic functional plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:10961-6.
- Koehl U, Sörensen J, Esser R, et al. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 2004; 33:261-6.
- Son YI, Dallal RM, Mailliard RB, et al. Interleukin-18 (IL-18) synergizes with IL-2 to enhance cytotoxicity, interferon-gamma production, and expansion of natural killer cells. *Cancer Res* 2001;61:884-8.
- Pérez-Martínez A, Fernández L, Valentín J, et al. A phase I/II trial of interleukin-15-stimulated natural killer cell infusion after haplo-identical stem cell transplantation for pediatric refractory solid tumors. *Cytotherapy* 2015;17:1594-603.
- Wang X, Lee DA, Wang Y, et al. Membrane-bound interleukin-21 and CD137 ligand induce functional human natural killer cells from peripheral blood mononuclear cells through STAT-3 activation. *Clin Exp Immunol* 2013;172:104-12.
- Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 2009;69:4010-7.
- Koehl U, Brehm C, Huenecke S, et al. Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front Oncol* 2013;3:118.
- Koehl U, Bochennek K, Esser R, et al. ISHAGE-based single-platform flow cytometric analysis for measurement of absolute viable T cells in fresh or cryopreserved products: CD34/CD133 selected or CD3/CD19 depleted stem cells, DLI and purified CD56+CD3- NK cells. *Int J Hematol* 2008;87:98-105.
- Blomberg K, Hautala R, Lövgren J, et al. Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand. *J Immunol Methods* 1996;193:199-206.
- Leivas A, Perez-Martinez A, Blanchard MJ, et al. Novel treatment strategy with autologous activated and expanded natural killer cells plus anti-myeloma drugs for multiple myeloma. *Oncoimmunology* 2016;5:e1250051.
- Kuzyk A, Mai S. c-MYC-induced genomic instability. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4:a014373.
- Sharma GG, Gupta A, Wang H, et al. hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene* 2003;22:131-46.
- Shah NN, Baird K, Delbrook CP, et al. Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 2015;125:784-93.
- Mishra A, Liu S, Sams GH, et al. Aberrant overexpression of IL-15 initiates large granular lymphocyte leukemia through chromosomal instability and DNA hypermethylation. *Cancer Cell* 2012;22:645-55.
- Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One* 2012;7:e30264.
- Somanchi SS, Lee DA. Ex vivo expansion of human NK cells using K562 engineered to express membrane bound IL21. *Methods Mol Biol* 2016;1441:175-93.
- Cho D, Shook DR, Shimasaki N, et al. Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin Cancer Res* 2010;16:3901-9.
- Fernández L, Valentín J, Zalacain M, et al. Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner. *Cancer Lett* 2015;368:54-63. ■

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website.

Table S1. Antibodies used in the study.

Fig. S1. Representative FCM data of NK cell receptors expression on resting NK cells, NKIL15, and NKAEs at Day 14.

Fig. S2. Genetic profile of NKAE cell products. Expression of Mbcr and Tert decreases along the culture. C-myc expression varies with culture time point, but is basal in the final cell product.



Original Articles

Haploidentical IL-15/41BBL activated and expanded natural killer cell infusion therapy after salvage chemotherapy in children with relapsed and refractory leukemia

M. Vela^a, D. Corral^b, P. Carrasco^c, L. Fernández^d, J. Valentín^a, B. González^b, A. Escudero^c, A. Balas^e, R. de Paz^f, J. Torres^g, A. Leivas^{h,i}, J. Martínez-Lopez^{h,i}, A. Pérez-Martínez^{a,b,*}

^a Translational Research in Pediatric Oncology, Hematopoietic Transplantation & Cell Therapy, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), Madrid, Spain

^b Pediatric Hemato-Oncology Unit, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

^c Molecular Pediatric Oncology Unit, Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

^d H120-CNIO Hematological Malignancies Clinical Research Unit, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain

^e Histocompatibility, Transfusion Center of the Autonomous Community of Madrid, Spain

^f Hematology Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

^g Clinical Immunology Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

^h Hematology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

ⁱ H120-CNIO Hematological Malignancies Clinical Research Unit, Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spain



ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2017

Received in revised form

1 February 2018

Accepted 21 February 2018

Keywords:

Natural killer cells

Hematopoietic stem cell transplantation

Immunotherapy

Acute myeloid leukemia

Lymphoblastic leukemia

Myeloblastic leukemia

ABSTRACT

Primary refractory or relapsed pediatric leukemia yield significant morbidity and mortality, with long-term survival rates <40%. Here we present a post-hoc analysis assessing safety and efficacy of infusing activated and expanded Natural Killer cells (NKAE) from haploidentical donors in patients from 2 clinical trials. In total, 18 children, adolescents and young adults with relapse or refractory acute leukemia were treated with two cycles of rescue chemotherapy followed by fresh NKAE cells infusions and low doses of IL-2. The overall response rate, complete remission achievement at the end of the study, was 72% (13 of 18). We infused 52 NKAE cell products containing a median of 6.76×10^5 NK cells/kg (0.7–34.16) and 0.49×10^5 T cells/kg (0–11). All infusions were well tolerated with no graft versus host disease nor other serious adverse events. Among the 14 patients who completed treatment, 4 of them are alive and leukemia-free more than 750 days post-transplant. We conclude that infusion of fresh NKAE cell therapy is feasible and safe in heavily pretreated pediatric population, and should be further investigated in advanced-phase clinical trials as well as a consolidation therapy to decrease relapse in patients with high-risk leukemia.

Trials registration: Registered at www.clinicaltrials.gov as NCT01944982 and NCT02074657.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Pediatric Hemato-Oncology Unit, Hospital Universitario La Paz, Paseo de la Castellana, 261, Madrid, 28046, Spain.

E-mail addresses: maria.vela@idipaz.es (M. Vela), dolorescorral@idipaz.es (D. Corral), mpilar.carrasco.sspa@juntadeandalucia.es (P. Carrasco), lfernandez@cnio.es (L. Fernández), jaime.valentin.quiroga@idipaz.es (J. Valentín), berta.gonzalez@salud.madrid.org (B. González), adela.escudero@salud.madrid.org (A. Escudero), abalas.trans@salud.madrid.org (A. Balas), mraquelde.paz@salud.madrid.org (R. de Paz), juan.torres@salud.madrid.org (J. Torres), aleivas@h12o.es (A. Leivas), jmarti01@ucm.es (J. Martínez-Lopez), aperezmartinez@salud.madrid.org (A. Pérez-Martínez).

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.02.033>

0304-3835/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

The incorporation of multidisciplinary treatment strategies over the last 20 years has resulted in major advances in the treatment of pediatric cancers, especially hematologic malignancies. Nearly 80% of children diagnosed with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and 60% diagnosed with acute myeloid leukemia (AML) are cured with current multiagent regimens and enjoy a relatively normal quality of life and subsequent development [1,2]. Despite well-recognized improvements in outcomes, primary refractory or relapsed pediatric leukemia still yield significant morbidity and mortality, with poor long-term survival rates — less than 40% [3,4]. Therefore, new therapeutic approaches that bypass the cellular mechanisms of

drug resistance are urgently needed, particularly for those patients with relapsed and refractory leukemia.

Natural Killer (NK) cells are lymphocytes from the innate immunity characterized by the expression of CD56 and/or CD16 and the lack of CD3. They have a critical role in immune control of tumor development and growth. Their antitumor activity relies on the balance of activating and suppressive signals including those delivered by killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) that recognize specific Major Histocompatibility Complex (MHC) class I alleles [5,6]. To ensure 'self-tolerance', NK cells are 'educated' or 'licensed' during their development [7]. They gain functional competence through a maturation process involving interactions between KIR receptors and their respective HLA ligands. Licensed NK cells that express, as their only inhibitory receptor, a KIR whose ligand is an HLA class I group that is absent on allogeneic targets, mediate alloreactions. Preclinical and clinical data from the haploidentical T cell-depleted transplantation setting have shown that haploidentical KIR ligand-mismatched NK cells play a main role as anti-leukemia effector cells [8–12].

Preclinical studies report how NK cells can target and kill leukemia cells without prior exposure to those cells and that the magnitude of NK cell cytotoxicity is directly proportional to the ratio between the number of NK cells and target cells [13,14]. For this reason, in order to achieve clinical benefits, large numbers of highly activated and cytotoxic NK cells are needed. As NK cells only represent 5–20% of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [15], various NK cells production protocols have been explored. NK-cell expansion in the presence of antigen presenting cells shows comparable *in vivo* survival with IL-2-mediated activation and can result in increased anti-tumor cytotoxicity [16,17]. Different cell types have been used to expand NK cells *in vitro*, including irradiated PBMCs, Epstein-Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines (EBV-LCL), and the K562 leukemia cell line genetically modified to express membrane-bound interleukin (IL)-15 and the 41BB ligand (K562-mb15-41BBL) [18,19].

The present analysis compiles data from two clinical trials where relapsed or refractory childhood leukemia/lymphoma patients were infused IL-15/41BBL activated and expanded NK (NKAE) cells from haploidentical donors after rescue chemotherapy. Two NKAE infusion schemes were followed. In the first clinical trial (HNJ-NKAES-2012) one NKAE cell product per expansion was infused, while in the second one (LYDIA) two NKAE cell products from each expansion were infused. The primary endpoint of both clinical trials was to assess the safety of infusing NKAE cells from haploidentical donors in combination with rescue chemotherapy.

Patients and methods

Patients

The population included in this analysis came from two open-label phase I/II trials: HNJ-NKAES-2012 (NCT01944982; EudraCT: 2012-000054-63); and LYDIA (NCT02074657; EudraCT: 2012-005146-38). Inclusion criteria were first or subsequent relapse of refractory T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (ALL-T) or AML and second or subsequent relapse of B cell lymphoblastic leukemia (ALL-B). The relatives of minor patients and those >18 years provided written informed consent before entering the trials in accordance with the Declaration of Helsinki, and all research was approved by the ethical committee of the Hospital Infantil Universitario La Paz.

Treatment plan

Based in the good tolerance of NK cell therapy and low doses of

IL-2 previously described by Rubnitz et al. [20], we established the following treatment plans:

Patients enrolled in HNJ-NKAES-2012 trial received two cycles of chemotherapy and one infusion of a maximum of 5×10^7 allogeneic NKAE cells/kg on day 0 of the first cycle and another infusion of a maximum of 1×10^8 allogeneic NKAE cells/kg on day 0 of the second cycle. They received intrathecal triple therapy (methotrexate, cytarabine, and hydrocortisone sodium succinate) before chemotherapy. Rescue chemotherapy consisted of nelarabine (Ara-G), etoposide (VP) and cyclophosphamide (Cy) according to Commander LA et al. [21]. On alternate days, 1×10^6 U/m² of IL-2 were administered subcutaneously for 6 doses starting on day 0 to activate and expand circulating donor NKAE cells (Fig. 1A).

The patients enrolled in LYDIA trial received two cycles of chemotherapy and two infusions of a maximum of 2.5×10^7 allogeneic NKAE cells/kg on days 0 and 7 of the first cycle and two infusions of a maximum of 5×10^7 /kg on days 0 and 7 of the second cycle. Three major pharmacological regimens were administered: CLOVE (clofarabine, etoposide and cyclophosphamide) [22,23]; FLAG-Ida (fludarabine, idarubicin, cytarabine and G-CSF) [24], and FluCy (fludarabine plus cyclophosphamide) [20] before NKAE cell infusion. As in the HNJ-NKAES-2012 trial, 1×10^6 U/m² of IL-2 were administered on alternate days starting on day 0 (Fig. 1B).

The chemotherapy regimen and the interval between cycles were decided by the investigators based on previous chemotherapy regimen and toxicities-recovery after first cycle, ranging from 3 to 8 weeks, ideally 4 weeks. The persistence of the disease after the first cycle was not an exclusion criterion.

HLA and KIR typing

HLA typing by PCR

Patients' and donors' DNA samples were HLA typed at the intermediate-resolution level for alleles at HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 loci by PCR amplification and oligonucleotide hybridization. Additionally, the KIR ligand HLA-C (C1 and C2) and the HLA-B (Bw4 and Bw6) allotypes were determined using high-resolution PCR-sequence-based typing commercial kits from Thermo Fisher, ELPHA and/or One Lambda.

Donor KIR B content score by PCR

Donors' fifteen human KIR genes and two pseudogenes were analyzed by PCR with a KIR typing kit (Miltenyi Biotec). We determined the KIR B content score for all the donors according to the system proposed by Cooley et al. [25] (www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html).

KIR mismatch analysis by flow cytometry

KIR receptors expression was studied in donors' NK cells by multiparameter flow cytometry. PBMCs were obtained from peripheral blood (PB) samples by centrifugation over a density gradient (Ficoll-Paque; GE Healthcare). NK population was identified gating CD56⁺/CD3⁻ cells. Frequencies of NK cells binding HLA-C1 (KIR2DL2⁺ or KIR2DL3⁺), HLA-C2 (KIR2DL1⁺) or HLA-Bw4 (KIR3DL1⁺) were measured using a Navios flow cytometer (Beckman Coulter). Antibodies used are listed in Suppl. Table 1.

Donor selection

The haploidentical donor was selected according to the following order of preference, as previously described [26]: (i) donor inhibitory KIR receptors and patient HLA-I ligand mismatch model; (ii) in the case of KIR-HLA match setting, KIR B haplotype donors were sought; (iii) if (i) and (ii) were not conclusive, we choosed the haploidentical donor whose NK cells showed the

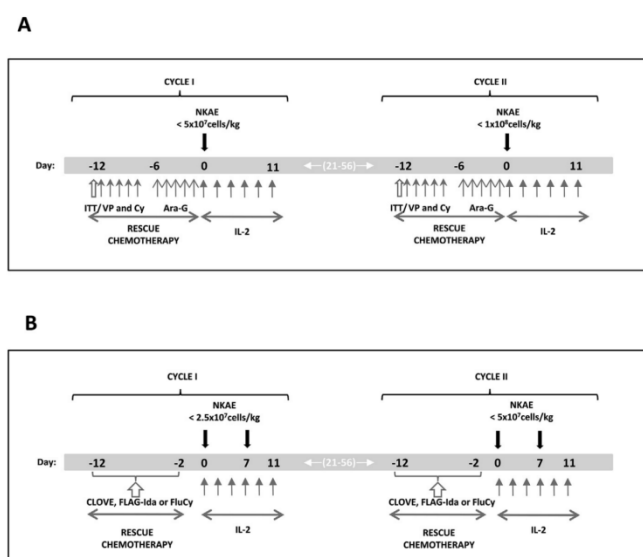


Fig. 1. Clinical trials treatment schedules.

Clinical trial HNJ-NKAES-2012 (A) and LYDIA (B) treatment plans. In both cases, two cycles of rescue chemotherapy followed by NKAE and IL-2 infusions were administered. IL-2: Interleukin-2 (10⁶ U/m²); ITT: Intrathecal Triple Therapy (methotrexate, cytarabine, and hydrocortisone sodium succinate; VP-16: Etoposide (100 mg/m²); CPM: Cyclophosphamide (440 mg/m²); Ara-G: Nelarabine (650 mg/m²).

highest *in vitro* cytotoxic activity against leukemia blast cells. In an absence of blasts, highest *in vitro* cytotoxicity against the K562 cell line was considered.

Immunomagnetic isolation of donor-derived NK cells for adoptive immunotherapy

Selected donors underwent one blood extraction of 250 ml of PB before each scheduled treatment cycle. The blood was collected in conventional bags with 15 IU/ml of sodium heparin in a facility complying good manufacturing practice (GMP). PBMCs were isolated by centrifugation over a density gradient (Ficoll-Paque; GE Healthcare). The GMP genetically modified K562-mbIL15-41BBL cell line, kindly provided by Professor D. Campana (National University of Singapore), was irradiated with 100 Gy. NKAES were obtained by co-culturing donor's PBMCs with K562-mb15-41BBL cells in a 1:1.5 ratio plus 100 U/ml of IL-2 over 14 days (LYDIA trial first infusion) or 21 days (HNJ-NKAES-2012 trial and LYDIA trial second infusion). In HNJ-NKAES-2012 trial, the final infused cell products contained >80% NK phenotype cells (CD56⁺/CD3⁺) and < 1 × 10⁶/kg of T phenotype cells (CD56⁺/CD3⁺). If T cells were present at higher numbers, CD3 cells were depleted from NKAE products using anti-CD3 antibody-coated beads and a CliniMACS device (Miltenyi Biotec). In LYDIA trial, this purity limits for NK and CD3 cells were not a discard criterion.

The safety and the lack of oncogenic effects of the NKAE end products were verified using real-time quantitative PCR (RQ-PCR) to detect c-MYC and telomerase reverse transcriptase (TERT) expression. Additionally, BCR-ABL RQ-PCR studies were performed using cDNA from NKAE cultures and from patient's PB after treatment in order to verify the absence of K562-mb15-41BBL cells in

NKAE end products [27].

Toxicity register criteria

The toxicity was classified according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0.

Response assessment

Patients with acute leukemia were assessed by bone marrow response after hematological recovery or, if there was no recovery, after a 6-week cycle. Complete remission (CR) was defined as tri-lineage hematopoietic recovery with less than 5% blasts in the marrow by morphologic assessment. Minimal residual disease (MRD) was defined as >0.1% blasts and was studied by flow cytometry as previously described [28–31]. The evaluation of the mass for mediastinal lymphomas was assessed by CT, PET-CT or X-Ray as follows: CR was defined as the disappearance of clinical symptoms and radiological findings. Partial response was defined as decrease in target lesion diameter sum >25%. No response was defined as decrease in target lesion diameter sum <25%.

Chimerism

Percentage of donor chimerism in the different blood cell populations was assessed using semi quantitative PCR-based analyses of polymorphic Short Tandem Repeat (STR) microsatellite regions as previously described (quantifiable limit 1–3%) [32,33]. For that purpose, eight STR and amelogenin polymorphisms were employed: D21S11, TPOX, D18S51, Penta E, VWA, D22S689, D7S820, Penta D.

When lineage-specific analysis was performed, different cell populations were collected using monoclonal antibodies against CD56 conjugated with ferromagnetic particles (Miltenyi Biotech). After incubation, positive and negative cellular fractions were collected using an autoMACS® device (Miltenyi Biotech).

Statistics

Descriptive statistics were used to characterize the population. Overall survival was calculated from the date of inclusion in the clinical trial until the date of death. Survival curves were constructed by the Kaplan–Meier method. The analyses were performed using GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software).

Results

Patients and donors

Patients characteristics are shown in Tables 1 and 2. Twenty eligible patients (7 in the HNJ-NKAES trial and 13 in the LYDIA trial) with relapsed or refractory ALL-B, ALL-T, AML, or biphenotypic acute leukemia (BAL) were enrolled. The mean age was 12 years (range 1–23). Ten of them had previously received a hematopoietic stem cell transplantation (HSCT).

All patients included in HNJ-NKAES trial received Ara-G/VP/Cy (n = 7); while patients included in LYDIA trial received CLOVE (n = 6), FLAG-ida (n = 3) or FluCy (n = 4) rescue chemotherapy.

Eighteen patients received at least one NKAES cell infusion. Two patients died of progressive disease (PD) before they could receive any NKAES infusion.

All NK cell donors were haploidentical related donors. PB extraction was performed without complications in all cases. Eighteen donors were parents of the patients and 2 were siblings. NK donor-recipient KIR mismatch and KIR haplotype score are shown in Supl Table 2.

NKAES cell products

We obtained 52 NKAES products with a median NK cells proportion of 85.4% (42.9–99). One product was discarded due to bacterial contamination. Two products needed additional T cell depletion before infusion. The characteristics of the infused products are shown in Table 3. More detailed information regarding NKAES and T cells total dose infused per patient is available in Suppl. Table 3.

c-Myc and TERT expression were not altered in the NKAES cell

end products compared to the starting cell population. BCR-ABL expression was undetectable after the first week of culture and was undetectable in patients' PBMCs after NKAES therapy, indicating no residual K562-mb15-411BBL cells presence in the infused products.

Safety of NK cell therapy

Adverse effects registered during HNJ-NKAES-2012 and LYDIA clinical trials are shown in Table 4. We observed fever related to NKAES infusion in 3 patients (15%). Two patients had low-grade fever and one patient had a local reaction in relation to the administration of IL-2 injections.

The chemotherapy caused a total of 22 episodes of febrile neutropenia (100% of patients that received CLOVE or FLAG-Ida, 67% of patients that received AraG-based chemotherapy and 0% of patients that received FluCy).

Bacterial infection was observed in 8 bacteremia episodes (4 *S. epidermidis*, 1 *E. coli*, 1 *K. pneumoniae*, 1 *P. pneumoniae*, 1 *C. sputigena*) and 1 *C. difficile* colitis. Viral infections were observed in 7 episodes (1 EBV reactivation, 1 HHV-6 viremia, 1 CMV encephalitis, 2 mucosal HSV-1 herpes, 1 cystitis by BK virus and 1 influenza B pneumonia). Fungal infection was diagnosed in 5 episodes, 4 aspergillosis (3 probable and 1 proven) and 1 hepatosplenic candidiasis. Additionally, one patient developed *Cryptosporidium* colitis.

During the trials 4 patients died due to chemotherapy-related toxicity: typhilitis (patient #12); pericardial tamponade probably related to clofarabine treatment (patient #8); severe somnolence related to nelarabine treatment in a patient who had previously received total body irradiation as conditioning regimen for a mismatch unrelated transplantation (patient #1); and a multi-drug resistant *K. pneumoniae*-mediated sepsis (patient #16).

Chimerism

Donor cell chimerism analysis was performed on 15 of the 18 patients who ultimately received an NKAES infusion. The maximum peak reached in each patient sample is shown in Table 2. Cell donor chimerism ranged from 1 to 3%, except for patient #16, who reached 95% of donor chimerism after a second cycle of 20%-reduced CLOVE, reflecting a severe myelosuppression state.

Cell donor chimerism was observed in 7 of the analyzed patients (46.7%). Of them, four achieved MRD- at the end of the trial (57.1%). In 8 patients no cell donor chimerism was detected (53.3%). Three of these patients achieved MRD- at the end of the trial (37.5%). Lymphocyte reconstitution in chimerism-detected and undetected patients showed no significant differences and no correlation between patients' outcome and donor chimerism was observed (Fig. 2).

Response

Evolution of blasts' percentage throughout the trials and representative clinical responses after therapy are shown in Fig. 3 and Suppl. Fig. 1.

The flow chart of the trial is shown in Fig. 4. A total of 18 patients were evaluated after the first cycle: 10 achieved CR/MRD-, 6 achieved CR/MRD+ and 2 patients, one from each trial, showed no remission.

At the end of the trial, 15 of 20 patients were alive. The evaluation of bone marrow response showed that 6 patients achieved CR/MRD-, 7 patients achieved CR/MRD+ and in 2 patients no remission was observed.

Following the trials a total of 10 patients proceeded to HSCT, one

Table 1
Patients demographics.

VARIABLE		
Age, mean (range)		12 (1–23)
Gender, n (%)	M	11 (55)
	F	9 (45)
Disease, n (%)	ALL-T	8 (40)
	ALL-B	5 (25)
	AML	6 (30)
	BAL	1 (5)
Previous HSCT, n (%)	Yes	10 (50)
	No	10 (50)
Status at inclusion in the trial, n (%)	Relapse	10 (50)
	Refractory	10 (50)
Haploidentical donor, n (%)	Parent	18 (90)
	Sibling	2 (10)

M: male; F: female; ALL-T: T cell acute lymphoblastic leukemia; ALL-B: B cell acute lymphoblastic leukemia; AML: acute myeloblastic leukemia; BAL: biphenotypic acute leukemia.

Table 2
Patients disease characteristics, treatment and current status.

Clinical trial	Patient	Age	Sex	Diagnosis	Previous HSCt	Status at trial inclusion	Chemotherapy	Cycles of treatment	NKAE donor	NKAE infusions	Mean infused NKAE cells (10 ⁶ ×kg)	Mean infused T cells (10 ⁶ ×kg)	Peak donor chimerism (%)	BM response	Status end of trial	Death cause	HSCt after trial	Status June 2017
HNJ-NKAES-2012	1	19	M	ALL-T	MMuD	relapse	AraG/VP/Cy	1	Parent	1	6.4	0	0	CR/MRD+	Died	Toxicity	No	Died
HNJ-NKAES-2012	2	6	F	ALL-T	Mrd	relapse	AraG/VP/Cy	2	Parent	2	18.7	0	3	CR/MRD-	Alive	Haploidentical		Died of TRM
HNJ-NKAES-2012	3	3	F	ALL-T	No	refractory	AraG/VP/Cy	1	Parent	1	26.6	0	1	PD	Alive	No		Died
HNJ-NKAES-2012	4	15	M	ALL-T	No	refractory	AraG/VP/Cy	2	Parent	2	8	0.69	ND	CR/MRD+	Alive	Haploidentical		Died of PD
HNJ-NKAES-2012	5	16	F	ALL-T	2 MrD	refractory	AraG/VP/Cy	2	Parent	2	12.7	0.78	2	CR/MRD-	Alive	Haploidentical		Died of PD
HNJ-NKAES-2012	6	10	M	ALL-T	Mrd	refractory	AraG/VP/Cy	2	Parent	2	14.5	0.48	0	CR/MRD+	Alive	Haploidentical		Died of PD
HNJ-NKAES-2012	7	11	F	ALL-T	No	relapse	AraG/VP/Cy	2	Parent	1	3	0.8	0	CR/MRD-	Alive	MuD		AliveMRD-
LYDIA	8	18	M	ALL-B	No	refractory	CLOVE	2	Parent	2	8.6	0.07	1.6	CR/MRD-	Died	Toxicity	No	Died
LYDIA	9	14	M	ALL-B	Haplo	relapse	CLOVE	0	Sibling	0	NA	NA	NA	NA	Died	PD	No	Died
LYDIA	10	4	F	AML	MuD/Haplo	relapse	FLAG-ida	2	Parent	4	16.5	0.28	0	CR/MRD+	Alive	Haploidentical		Died of PD
LYDIA	11	15	M	BAL	No	refractory	FLAG-ida	2	Parent	4	1.9	0.22	ND	CR/MRD-	Alive	Haploidentical		Alive MRD-
LYDIA	12	23	M	AML	No	refractory	CLOVE	1	NA	0	NA	NA	NA	NA	Died	Toxicity	No	Died
LYDIA	13	13	M	AML	No	refractory	FluCy	2	Parent	4	4.3	0.65	0	PD	Alive	No		Died
LYDIA	14	9	F	AML	No	relapse	FluCy	2	Parent	4	10.3	1.83	0	CR/MRD+	Alive	No		Died of PD
LYDIA	15	16	F	ALL-T	2 MrD	relapse	CLOVE	2	Parent	4	5.4	0.59	2	CR/MRD-	Alive	No		Died of PD
LYDIA	16	9	F	AML	No	relapse	CLOVE	2	Parent	4	10.5	1.90	95	CR/MRD-	Died	Toxicity	No	Died
LYDIA	17	17	M	ALL-B	Haplo	refractory	FluCy	2	Parent	4	7.8	0.38	2	CR/MRD+	Alive	No		Died of PD
LYDIA	18	1	M	ALL-B	MuD (CB)	relapse	FLAG-ida	2	Parent	4	31.5	7.05	0	CR/MRD-	Alive	MuD		Died of TRM
LYDIA	19	12	F	ALL-B	No	refractory	CLOVE	1	Parent	2	6.1	0.48	0	CR/MRD-	Alive	Haploidentical		Alive MRD-
LYDIA	20	10	M	AML	Haplo	relapse	CLOVE	2	Sibling	4	8	0.24	ND	CR/MRD+	Alive	Haploidentical		Alive MRD-

M: male; F: female; ALL-T: T cell acute lymphoblastic leukemia; ALL-B: B cell acute lymphoblastic leukemia; AML: acute myeloblastic leukemia; BAL: biphenotypic acute leukemia; MuD: mismatch unrelated donor; MrD: match related donor; Haplo: haploidentical donor; CB: cord blood; AraG: nelarabine; VP: etoposide; Cy: cyclophosphamide; CLOVE: clofarabine + cyclophosphamide + etoposide; FLAG-ida: fludarabine + idarubicine + cytarabine + G-CSF; Flu-Cy: fludarabine + cyclophosphamide; NA: not applicable; ND: not done; TRM: transplant-related mortality; PD: progressive disease; CR: complete remission; MRD: minimal residual disease.

Table 3
Characterization of NKAE infusions.

	Median (range)
Cells	335.6 (65.3–921)
Cells/kg ($\times 10^6$)	8.5 (1.2–48.8)
NK cells ($\times 10^6$)	302.9 (16.8–853.8)
NK cells (%)	85.4 (42.9–99)
NK cells/kg ($\times 10^6$)	6.8 (0.6–34.2)
T cells ($\times 10^6$)	22.6 (0–175)
T cells (%)	7.3 (0–37)
T cells/kg ($\times 10^6$)	0.5 (0–11)
NKT cells ($\times 10^6$)	13.8 (0–350.3)
NKT cells (%)	3.7 (0–28.3)
NKT cells/kg ($\times 10^6$)	0.3 (0–14.6)

NK cell: Natural Killer cell, NKT cell: Natural Killer T cell.

patient received palliative care and one patient was enrolled in another clinical trial. Of the HSCT-receiving patients, 6 finally died, 4 due to PD and 2 due to transplant-related toxicity (TRM). In September 2017, 4 patients were alive (with no evidence of disease, median of follow-up of 750 days [range, 613–1001]). Both clinical trials data and overall survival are summarized in Table 5 and Fig. 5, respectively.

Discussion

Treatment of hematological malignant disorders has improved over the last years, but high relapse rate, mainly attributable to the presence of MRD, still persists. Therefore, it is of great interest to explore novel therapeutic strategies to obtain long-term remission in heavily pre-treated patients. Cell therapy is a promising alternative to harsh chemotherapy and radiation. Particularly, the ability of NK cells to eradicate leukemic blasts is well documented and

represents a promising arm of therapy for chemotherapy-resistant disease [34,35]. In this regard, it is necessary to build a solid foundation establishing the safety and feasibility of infusing these cells in patients with cancer prior to its implementation in the clinical practice. To the best of our knowledge, this is the largest report to date of pediatric patients treated with *ex vivo* expanded NK cells.

There is some literature about adoptively transferred haploidentical NK cells in clinical trials, mainly using resting NK cells [8,20] or IL-2-cultured NK cells [36–38]. In most cases, systemic IL-2 was administered following NK infusion. The use of activated and expanded NK cells co-cultured with human derived antigen presenting cells is an emerging alternative [39–41].

Preclinical studies have demonstrated that expansion using the K562 leukemia cell line genetically modified to express membrane-bound IL-15 and the 41BB ligand upregulates NK activating receptors expression and augments NK killing capacity [18,42]. However, their potential adverse effects should be carefully evaluated. A recent study from Shah et al. [43] reported acute graft versus host disease (GVHD) in 5 out of 9 patients receiving IL-15/41BBL activated NK cells following HLA-matched, T-cell-depleted HSCT. In contrast to Shah et al., we have observed neither GVHD nor other serious adverse reactions attributed to NKAE therapy in any of the patients studied, despite up to 11×10^6 haploidentical T cells/kg infused. Our studies are out of the TPH setting, include low dose IL-2 administration, which may have a protective effect on GVHD because of expansion of regulatory populations [44,45] and infused NKAE end products include no stimulatory K562-mb15-41BBL cells that potentially could trigger a GVHD response. Our results indicate that therapy with IL-15/41BBL NKAE cells is well tolerated in this setting. We have observed a single case of GVHD reactivation after the first HNJ-NKAES-2012 treatment cycle. The patient had previously received a mismatched unrelated donor transplantation

Table 4
Adverse effects related to chemotherapy, to IL-2 and to NKAE infusion.

CHEMOTHERAPY-RELATED ADVERSE EFFECTS		Grade									
SOC	CTCAE Term	1		2		3		4		5	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Blood and lymphatic system disorders	Febrile neutropenia	0	0	0	0	18	53	4	12	0	0
	Anemia	4	20	7	35	8	40	0	0	0	0
Cardiac disorders	Pericardial tamponade	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5
Gastrointestinal Disorders	Gastrointestinal toxicity	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abdominal pain	5	25	1	5	0	0	0	0	0	0
	Typhilitis	0	0	0	0	1	5	0	0	1	5
	Oral mucositis	0	0	5	25	2	10	0	0	0	0
Hepatobiliary disorders	Hepatic failure	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0
Infections and infestations	Cystitis	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0
	Encephalitis Infection	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0
	Sepsis	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5
	Somnolence	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5
Nervous system disorders											
IL-2 INFUSION-RELATED ADVERSE EFFECTS		Grade									
SOC	CTCAE Term	1		2		3		4		5	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
General disorders and administration site conditions	Pyrexia	0	0	2	10	0	0	0	0	0	0
	Local inflammation	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0
NKAE INFUSION-RELATED ADVERSE EFFECTS		Grade									
SOC	CTCAE Term	1		2		3		4		5	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
General disorders and administration-site conditions	Pyrexia	2	10	1	5	0	0	0	0	0	0

SOC: System Organ Class; CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events; N: Number of cases of the indicated event registered; %: Percentage of patients suffering the indicated event.

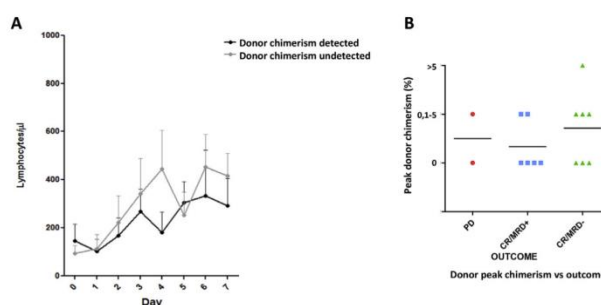


Fig. 2. Lymphocyte reconstitution and outcome in chimerism-detected and undetected patients.

A: Mean and SEM of lymphocyte counts of patients after the first cycle of chemotherapy followed by NKAE cells infusion. **B:** Peak donor chimerism versus outcome in patients that presented progressive disease (PD), complete remission with positive minimal residual disease (CR/MRD+) or complete remission with no minimal residual disease (CR/MRD-) at the end of the trials.

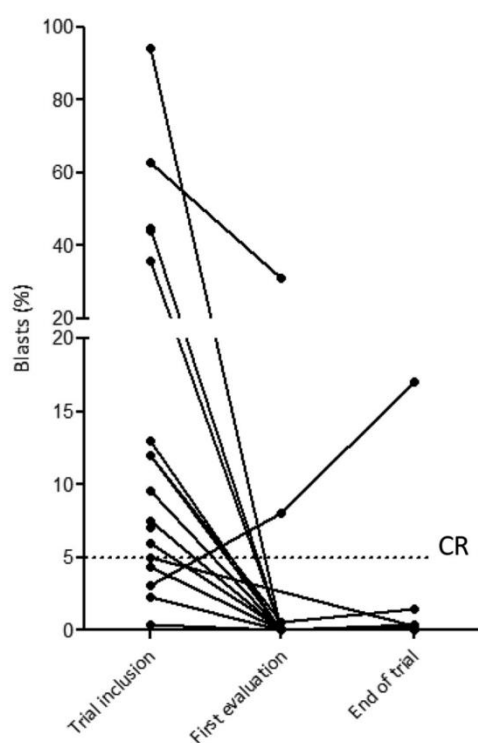


Fig. 3. Bone marrow response to treatment.

Percentage of blasts of each patient at trial inclusion, after first treatment cycle and at the end of the study are indicated. CR: Complete remission.

(MMuD). Our plausible explanation is that combined chemotherapy and NKAE cell infusion decreased the leukemia burden and

re-established MMuD chimerism, reactivating previous GVHD. The serious adverse effects observed in our trials were not related to NKAE or IL-2 infusions, but were, as expected, infection episodes as well as other severe toxicities derived of intensive chemotherapy treatment (typhilitis, pericardial tamponade, severe somnolence).

NK cell therapy can be derived from autologous or from allogeneic sources. Leukemia and lymphoma patients' autologous NK cells might have functional defects [46]. In contrast, allogeneic NK cells from non-HLA identical related healthy donors, as proposed in this study, not only have normal function but can also enhance the graft versus leukemia effect via KIR-HLA-I mismatch [47,48]. The data obtained in our trials, however, shows no differences in overall survival among KIR matched and KIR mismatched allogeneic NK treated patients. Infused NKAE have an extremely activated phenotype [42,43], so KIR mismatch presumably does not augments its already exacerbated cytotoxic capacity.

One of the critical drawbacks in NK cell immunotherapy has been the lack of a large-scale clinical grade NK cell expansion method. NK cells comprise only a limited number of PBMCs and their isolation requires a costly selection process. In our report, NKAE cell infusions were performed after 14–21 days of GMP procedure, which represents a reasonable time frame in patients that require immediate treatment options, confirming the feasibility of this therapy. In the HNJ-NKAES-2012 trial the designed schedule allowed a single infusion but of larger cell numbers. In LYDIA trial an additional NKAE product was infused, but the amount of NKAE cells available for that infusion was lower than expected. In our short cohort-studies we cannot conclude which schedule is better in terms of bone marrow response or donor chimerism peak. Randomized studies are needed to determine the optimal therapeutic regimen. Major challenges, such as the best method to obtain the large number of NK cells needed to make cell-based therapy cost-effective and to enhance effector cells activity, remain open.

Biological features, such as number of NKAE cells infused and its immunophenotype, were evaluated in an effort to correlate these data with patients' outcome. Although not statistically significant, on account of the limited sample size, a correlation between the number of infused NKAE and CR achievement was observed (Suppl. Fig. 2A). As described, donor T lymphocytes could induce a graft versus leukemia effect. Donor lymphocyte infusion is commonly used to treat leukemia relapse following HSCT [49]. In our trials, we have observed a correlation between the number of T lymphocytes infused and better outcome (Suppl. Fig. 2B). NKAE

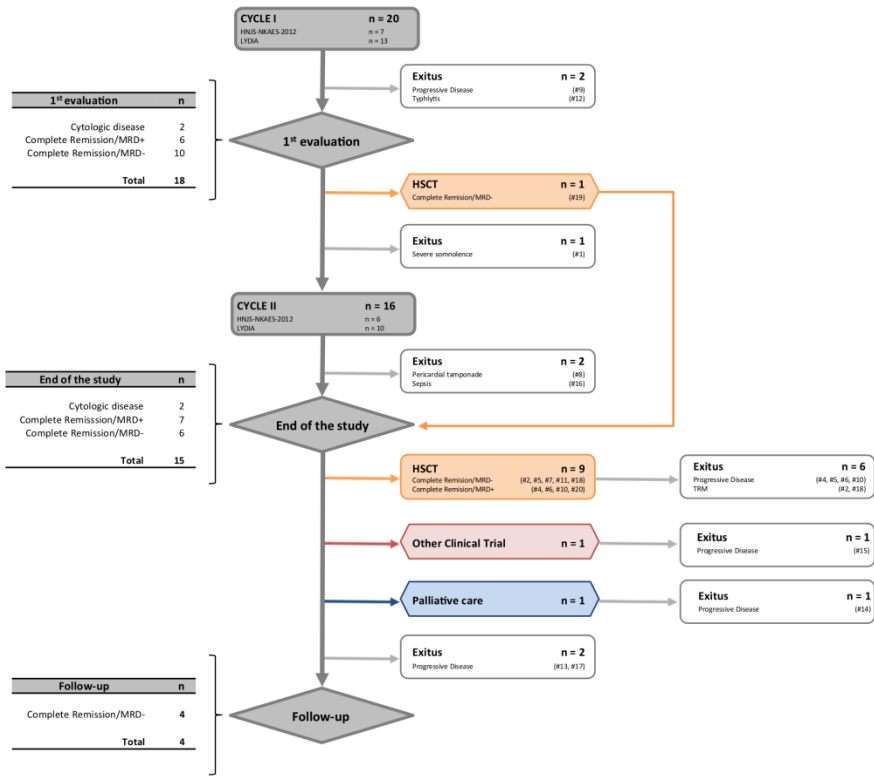


Fig. 4. Flow chart of the subjects who participated in the clinical trials. Treatment responses were evaluated after cycle I, at the end of the study and during the follow-up period (up to 1000 days). Patients that received a HSCT are indicated in orange boxes, patients derived to other clinical trials in red boxes, patients entering palliative care programs in blue boxes, and those who died in white boxes.

Table 5
End of trials (HNJ-NKAE5-2012 and LYDIA) summary.

FINAL CAUSE OF DEATH	n (%)
Chemotherapy toxicity	4 (20)
Progressive disease	1 (5)
BONE MARROW RESPONSE	n (%)
Non complete remission	2 (10)
Complete remission/MRD+	7 (35)
Complete remission/MRD-	6 (30)
SURVIVAL	n (%)
End of the trial survival	14 (70)
Follow up survival	4 (20)
DONOR CHIMERISM DETECTED	n (%)
Donor chimerism = 0%	8 (53)
Donor chimerism 0.1–5%	6 (40)
Donor chimerism > 5%	1 (7)

MRD: Minimal Residual Disease.

expression level of KIR2DL1 and KIR2DL2 receptors was also associated with a better response (Suppl. Fig. 3). The leukemic blasts of the patients were also evaluated. ULBP1, ULBP2 and ULBP4 expression was apparently correlated with a worse response to

treatment (Suppl. Fig. 4). These data might suggest additional immunoescape mechanisms developed by these blasts theoretically good responders to NK cell therapy [50,51]. In addition, we assayed *in vitro* donors' NK cytotoxicity against patients' blasts. Higher *in vitro* NK cytotoxicity against patients' blasts showed a trend towards a better outcome (Suppl. Fig. 5).

The setting proposed in this study suggests clinical efficacy of combining chemotherapy and haploidentical IL-15/41BBL activated and expanded NK cell therapy. Among the 18 heavily pretreated patients who received chemotherapy and NK cells, 10 proceeded to HSCT and 4 are alive at the end of the trial, which represent 55.5% and 22.2% of the studied population, respectively. We propose NKAE cell therapy as a complement to chemotherapy in order to eliminate chemotherapy-resistant leukemic cells, responsible of relapse and refractoriness [52,53]. NK cell responses are short in time, so this cell therapy constitutes a bridge treatment to a consolidation procedure such as an allogeneic HSCT. Indeed, in our trials, all patients currently alive received an HSCT after trial completion (n = 4).

A limitation of our study is that the specific contribution to patients' outcome of the NK cell infusions alone cannot be

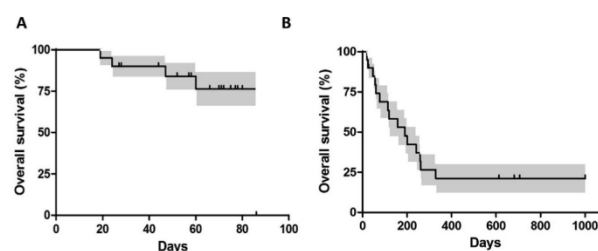


Fig. 5. Overall survival of patients enrolled in the clinical trials.

Kaplan-Meier survival curves of patients enrolled in HNJ-NKAES-2012 and LYDIA trials at the end of the study (A) and after the follow-up period (B).

determined. It is remarkable that all patients that achieved a HSCT after the trial had received high-intensity rescue chemotherapy, while no patients who received FluCy achieved it. 100% of patients who received FLAG-Ida (3 out of 3), 71.4% of patients who received AraG/VP/Cy (5 out of 7), and 33.3% of patients who received CLOVE (2 out of 6) got a transplantation. CLOVE, on the other hand, showed the highest toxicity rate (50% of CLOVE-treated patients died of chemotherapy-related toxicity). Previous clinical trials to treat relapsed/refractory leukemia/lymphoma using CLOVE already reported febrile neutropenia and high rate of infections as common adverse effects [22,23,54]. Hijiya et al. [23], in a study with a cohort of 25 relapsed/refractory ALL patients, reported 7 cases of death related to CLOVE treatment: veno-occlusive disease (2), septic shock (2), acute renal failure (1), pulmonary edema (1), and infection (lung/fungal) (1). In this study, the overall survival after 217 days was 24%. Tavil et al. [24], in a study with a cohort of 25 poor prognosis AML/ALL patients treated with FlagIda reported 20% overall survival (1200 days). Finally, Commander et al. [21], in a cohort of 7 patients with relapsed/refractory T-ALL/lymphoma treated with AraG/VP/Cy chemotherapy described 14% overall survival (450 days). Our trials combining different chemotherapeutic strategies and NKAES and IL-2 infusions led to a 20% overall survival after 750 days. The balance between efficacy and acceptable toxicity, according to our data would be FLAG-Ida or AraG/VP/Cy regimens. The adverse effects observed in those patients in our study, including febrile neutropenia, mucositis, infections and AraG-related neurotoxicity, correspond in frequency and severity with that found in the literature [20,21,23].

The present study shows that the activation and expansion of NK cells using the K562-mb15-41BBL cell line is feasible and allows secure and effective infusions of NK cells in relapsed/refractory leukemia/lymphoma. Our results, together with previous reports, have encouraged us to investigate NK cell therapy not only for patients with relapsed/refractory cancer, but also as a consolidation therapy in AML patients with cytological remission (ongoing clinical trial NCT02763475). Further clinical trials are therefore warranted to assess the efficacy of NKAES in the management of cancer patients in various settings.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The relatives of minor patients and those >18 years provided written informed consent before entering the trials in accordance with the Declaration of Helsinki, and all research was approved by the ethical committee of the Hospital Infantil Universitario La Paz (Madrid, Spain).

Competing interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding

This work was supported in part by the National Health Service of Spain, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), FIS: EC81/00457 and PI15/00973, FONDOS FEDER and the CRIS Cancer Foundation (<http://criscancer.org>).

Author's contributions

All authors contributed to data collection and interpretation. MV was major contributor in writing the manuscript. AP-M supervised the studies.

Acknowledgements

We are indebted to all the patients who agreed to participate in this trial, as well as to the personnel of the hospital involved in the study for their support and for sample collection.

List of Abbreviations

ALL-B	B cell lymphoblastic leukemia
ALL-T	T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma
AML	Acute myeloid leukemia
Ara-G	Nelarabine
BAL	Biphenotypic acute leukemia
CLOVE	Clofarabine, etoposide and cyclophosphamide
CR	Complete remission
CTCAE	Common terminology criteria for adverse events
Cy	Cyclophosphamide
EBV	Epstein-Barr virus
FLAG-Ida	Fludarabine, idarubicin, cytarabine and G-CSF
FluCy	Fludarabine and cyclophosphamide
GMP	Good manufacturing practice
GVHD	Graft versus host disease
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation
IL	Interleukin
ITT	Intrathecal triple therapy
KIR	Killer immunoglobulin-like receptor
MMuD	Mismatched unrelated donor transplantation
MRD	Minimal residual disease
NKAES	Activated and expanded Natural Killer cells

PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PD	Progressive disease
TRM	Transplant-related toxicity
VP	Etoposide

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.02.033>

References

- [1] B.E. Gibson, D.K. Webb, A.J. Howman, S.S. de Graaf, C.J. Harrison, K. Wheatley, Results of a randomized trial in children with Acute Myeloid Leukemia: medical research council AML12 trial, *Br. J. Haematol.* 155 (2011) 366–376, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08851.x>.
- [2] J.B. Nachman, N.A. Heerema, H. Sather, B. Camitta, E. Forestier, C.J. Harrison, N. Dastugue, M. Schrappe, C.H. Pui, G. Basso, et al., Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 110 (2007) 1112–1115.
- [3] G. Tallen, R. Ratei, G. Mann, G. Kaspers, F. Niggli, A. Karachunsky, W. Ebell, G. Escherich, M. Schrappe, T. Klingebiel, et al., Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90, *J. Clin. Oncol.* 28 (14) (2010) 2339–2347, <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.1983>.
- [4] G.J. Kaspers, M. Zimmermann, D. Reinhardt, B.E. Gibson, R.Y. Tammenga, O. Aleinikova, H. Armendariz, M. Dworzak, S.Y. Ha, H. Hasle, et al., Improved outcome in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: results of a randomized trial on liposomal daunorubicin by the International BFM Study Group, *J. Clin. Oncol.* 31 (2013) 599–607, <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.7384>.
- [5] S.S. Farag, M.A. Caligiuri, Human natural killer cell development and biology, *Blood Rev.* 20 (3) (2006) 123–137.
- [6] C. Guillery, N.D. Huntington, M.J. Smyth, Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy, *Nat. Immunol.* 17 (9) (2016) 1025–1036, <https://doi.org/10.1038/ni.3518>.
- [7] S. Kim, J. Poursine-Laurent, S.M. Truscott, L. Lybarger, Y.J. Song, L. Yang, A.R. French, J.B. Sunwoo, S. Lemieux, T.H. Hansen, et al., Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules, *Nature* 436 (2005) 709–713.
- [8] A. Curti, L. Ruggeri, A. D'Addio, A. Bontadini, E. Dan, M.R. Motta, S. Trabaneli, V. Giudice, E. Urbani, G. Martinelli, et al., Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients, *Blood* 118 (12) (2011) 3273–3279, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-329508>.
- [9] L. Ruggeri, M. Capanni, M. Casucci, I. Volpi, A. Tosti, K. Perruccio, E. Urbani, R.S. Negrin, M.F. Martelli, A. Velardi, Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation, *Blood* 94 (1) (1999) 333–339.
- [10] A. Pérez-Martínez, W. Leung, E. Muñoz, R. Iyengar, M. Ramírez, J.L. Vicario, A. Lassaletta, J. Sevilla, M. González-Vicent, L. Madero, et al., KIR-HLA receptor-ligand mismatch associated with a graft-versus-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric metastatic solid tumors, *Pediatr. Blood Cancer* 53 (1) (2009) 120–124, <https://doi.org/10.1002/pbc.21955>.
- [11] A. Pérez-Martínez, I. de Prada Vicente, I. Fernández, M. González-Vicent, J. Valentín, R. Martín, H. Maxwell, J. Sevilla, J.L. Vicario, M.A. Díaz, Natural killer cells can exert a graft-vs-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric solid tumors, *Exp. Hematol.* 40 (11) (2012) 882–891, <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2012.07.004>.
- [12] A. Pérez-Martínez, M. González-Vicent, J. Valentín, E. Aleo, A. Lassaletta, J. Sevilla, J.L. Vicario, M. Ramírez, M.A. Díaz, Early evaluation of immune reconstitution following allogeneic CD3/CD19-depleted grafts from alternative donors in childhood acute leukemia, *Bone Marrow Transplant.* 47 (11) (2012) 1419–1427, <https://doi.org/10.1038/bmt.2012.43>.
- [13] R. Kiessling, E. Klein, H. Wigzell, "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype, *Eur. J. Immunol.* (5) (1975) 112–117.
- [14] R.B. Herberman, M.E. Nunn, D.H. Lavrin, Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity, *Int. J. Cancer* (16) (1975) 216–229.
- [15] I. Waldhauer, A. Steine, NK cells and cancer immunosurveillance, *Oncogene* 27 (45) (2008) 5932–5943, <https://doi.org/10.1038/onc.2008.267>.
- [16] M. Berg, A. Lundqvist, P. McCoy Jr., L. Samset, Y. Fan, A. Tawab, R. Childs, Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells, *Cytotherapy* 11 (2009) 341–355, <https://doi.org/10.1080/14653240902807034>.
- [17] G. Pittari, P. Filippini, G. Gentile, J.C. Grivel, S. Rutella, Revving up natural killer cells and cytokine-induced killer cells against hematological malignancies, *Front. Immunol.* 6 (2015) 230, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00230>.
- [18] H. Fujisaki, H. Kakuda, N. Shimasaki, C. Imai, J. Ma, T. Lockey, P. Eldridge, W.H. Leung, D. Campana, Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy, *Cancer Res.* 69 (2009) 4010–4017, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3712>.
- [19] M.R. Parkhurst, J.P. Riley, M.E. Dudley, S.A. Rosenberg, Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression, *Clin. Cancer Res.* 17 (2011) 6287–6297, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1347>.
- [20] J.E. Rubnitz, H. Inaba, R.C. Ribeiro, S. Pounds, B. Rooney, T. Bell, C.H. Pui, W. Leung, NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia, *J. Clin. Oncol.* 28 (6) (2010) 955–959, <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.4590>.
- [21] L.A. Commander, A.E. Seif, I.G. Inosigna, S.R. Rheingold, Salvage therapy with nelarabine, etoposide, and cyclophosphamide in relapsed/refractory paediatric T-cell lymphoblastic leukaemia and lymphoma, *Br. J. Haematol.* 150 (3) (2010) 345–351, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08236.x>.
- [22] N. Gossai, M.R. Verneris, N.A. Karas, M.F. Gorman, N.J. Patel, M.J. Burke, A clofarabine-based bridging regimen in patients with relapsed ALL and persistent minimal residual disease (MRD), *Bone Marrow Transplant.* 49 (3) (2014) 440–442, <https://doi.org/10.1038/bmt.2013.195>.
- [23] N. Hijiya, B. Thomson, M.S. Isakoff, L.B. Silverman, P.G. Steinherz, M.J. Borowitz, R. Kadota, T. Cooper, V. Shen, G. Dahl, et al., Phase 2 trial of clofarabine in combination with etoposide and cyclophosphamide in pediatric patients with refractory or relapsed acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 118 (2011) 6043–6049, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374710>.
- [24] B. Tavit, S. Aytac, Y.I. Balci, S. Unal, B. Kuskonmaz, S. Yetgin, A. Gurgey, M. Tuncer, F. Gumruk, D. Uckan, et al., Fludarabine, cytarabine, granulocyte colony-stimulating factor, and idarubicin (FLAG-IDA) for the treatment of children with poor-prognosis acute leukemia: the Hacettepe experience, *Pediatr. Hematol. Oncol.* 27 (7) (2010) 517–528, <https://doi.org/10.3109/08880018.2010.493578>.
- [25] S. Cooley, E. Trachtenberg, T.L. Bergemann, K. Saetern, J. Klein, C.T. Le, S.G. Marsh, L.A. Guethlein, P. Parham, J.S. Miller, et al., Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia, *Blood* 113 (2009) 726–730, <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-171926>.
- [26] A. Pérez-Martínez, I. Fernández, J. Valentín, I. Martínez-Romera, M.D. Corral, M. Ramírez, L. Abad, S. Santamaría, M. González-Vicent, S. Sirvent, J. Sevilla, J.L. Vicario, I. de Prada, M.A. Díaz, A phase I/II trial of interleukin-15-stimulated natural killer cell infusion after haplo-identical stem cell transplantation for pediatric refractory solid tumors, *Cytotherapy* 17 (11) (2015) 1594–1603, <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.07.011>.
- [27] J. Gabert, E. Beillard, V.H. van der Velden, W. Bi, D. Grimwade, N. Pallisgaard, G. Barbany, G. Cazzaniga, J.M. Cayuela, H. Cavé, et al., Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe against Cancer program, *Leukemia* 17 (2003) 2318–2357.
- [28] H. Inaba, E. Coustan-Smith, X. Cao, S.B. Pounds, S.A. Shurtleff, K.Y. Wang, S.C. Raimondi, M. Onciu, J. Jacobsen, R.C. Ribeiro, et al., Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia, *J. Clin. Oncol.* 30 (2012) 3625–3632, <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.5323>.
- [29] E. Coustan-Smith, G. Song, C. Clark, L. Key, P. Liu, M. Mehrpooya, P. Stow, X. Su, S. Shurtleff, C.H. Pui, J.R. Downing, D. Campana, New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia, *Blood* 117 (2011) 6267–6276, <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-324004>.
- [30] J.E. Rubnitz, H. Inaba, G. Dahl, R.C. Ribeiro, W.P. Bowman, J. Taub, S. Pounds, B.I. Razzouk, N.J. Lacayo, X. Cao, et al., Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukemia: results of the AML02 multicenter trial, *Lancet Oncol.* 11 (6) (2010) 543–552, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70090-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70090-5).
- [31] U. Creutzig, M.M. van den Heuvel-Eibrink, B. Gibson, M.N. Dworzak, S. Adachi, E. de Bont, J. Harbott, H. Hasle, D. Johnston, A. Kinoshita, et al., Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel, *Blood* 120 (2012) 3187–3205, <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-362608>.
- [32] H. Kreyenberg, W. Holle, S. Mohrle, D. Niethammer, P. Bader, Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Tuebingen experience, *Leukemia* 17 (1) (2003) 237–240.
- [33] P. Bader, C. Niemeyer, A. Willasch, H. Kreyenberg, B. Strahm, B. Kremens, B. Gruhn, D. Dilloo, J. Vormoor, P. Lang, et al., Children with myelodysplastic syndrome (MDS) and increasing mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation have a poor outcome which can be improved by pre-emptive immunotherapy, *Br. J. Haematol.* 128 (2005) 649–658.
- [34] F. Locatelli, F. Moretta, L. Brescia, P. Merli, Natural killer cells in the treatment of high-risk acute leukaemia, *Semin. Immunol.* 26 (2014) 173–179, <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.004>.
- [35] T. Sutlu, E. Alici, Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects, *J. Intern. Med.* 266 (2) (2009) 154–181, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02121.x>.

- [36] J.S. Miller, Y. Soignier, A. Panoskaltis-Mortari, S.A. McNamee, G.H. Yun, S.K. Fautsch, D. McKenna, C. Le, T.E. Defor, L.J. Burns, et al., Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer, *Blood* 105 (2005) 3051–3057.
- [37] J. Shi, G. Tricot, S. Szmania, N. Rosen, T.K. Garg, P.A. Malaviarachchi, A. Moreno, B. Dupont, K.C. Hsu, L.A. Baxter-Lowe, et al., Infusion of haplo-identical killer immunoglobulin-like receptor ligand mismatched NK cells for relapsed myeloma in the setting of autologous stem cell transplantation, *Br. J. Haematol.* 143 (5) (2008) 641–653, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07340.x>.
- [38] V. Bachanova, S. Cooley, T.E. Defor, M.R. Verneris, B. Zhang, D.H. McKenna, J. Curtsinger, A. Panoskaltis-Mortari, D. Lewis, K. Hippen, et al., Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein, *Blood* 123 (25) (2014) 3855–3863, <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-532531>.
- [39] A. Leivas, A. Perez-Martinez, M.J. Blanchard, E. Martín-Clavero, L. Fernández, J.J. Lahuerta, J. Martínez-López, Novel treatment strategy with autologous activated and expanded natural killer cells plus anti-myeloma drugs for multiple myeloma, *Oncoimmunology* 5 (12) (2016), <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1250051> e1250051.
- [40] E. Ishikawa, K. Tsuboi, K. Saijo, H. Harada, S. Takano, T. Nose, T. Ohno, Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma, *Anticancer Res.* 24 (3b) (2004) 1861–1871.
- [41] S. Szmania, N. Lapteva, T. Garg, A. Greenway, J. Ling, B. Nair, K. Stone, E. Woods, J. Khan, J. Stivers, et al., Ex vivo-expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation in vivo in high-risk relapsed multiple myeloma patients, *J. Immunother.* 38 (2015) 24–36, <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000059>.
- [42] D. Cho, D.R. Shook, N. Shimasaki, Y.H. Chang, H. Fujisaki, D. Campana, Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors, *Clin Cancer Res.* 16 (15) (2010) 3901–3909, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0735>.
- [43] N.N. Shah, K. Baird, C.P. Delbrook, T.A. Fleisher, M.E. Kohler, S. Rampertaap, K. Lemberg, C.K. Hurley, D.E. Kleiner, M.S. Merchant, et al., Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following T-cell depleted stem cell transplantation, *Blood* 125 (5) (2015) 784–792, <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-592881>.
- [44] M. Sykes, M.W. Harty, G.L. Szot, D.A. Pearson, Interleukin-2 inhibits graft-versus-host disease-promoting activity of CD4+ cells while preserving CD4+ and CD8-mediated graft-versus-leukemia effects, *Blood* 83 (9) (1994) 2560–2569.
- [45] Y. Zhang, G. Joe, E. Hexner, J. Zhu, S.G. Emerson, Host-reactive CD8+ memory stem cells in graft-versus-host disease, *Nat. Med.* 11 (12) (2005) 1299–1305, <https://doi.org/10.1038/nm1326>.
- [46] M. Terme, E. Ullrich, N.F. Delahaye, N. Chaput, L. Zitvogel, Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies, *Nat. Immunol.* 9 (5) (2008) 486–494, <https://doi.org/10.1038/ni1580>.
- [47] O. Lim, M.Y. Jung, Y.K. Hwang, E.C. Shin, Present and future of allogeneic natural killer cell therapy, *Front. Immunol.* 6 (2015) 286, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00286>.
- [48] R. Handgretinger, P. Lang, M.C. André, Exploitation of natural killer cells for the treatment of acute leukemia, *Blood* 127 (26) (2016) 3341–3349, <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-629055>.
- [49] P. Rujkijyanont, C. Morris, G. Kang, K. Gan, C. Hartford, B. Triplett, et al., Risk-adapted donor lymphocyte infusion based on chimerism and donor source in pediatric leukemia, *Blood Canc. J.* 3 (8) (2013) e137–, <http://doi.org/10.1038/bcj.2013.39>.
- [50] A. Baragano Raneros, B. Suarez-Álvarez, C. López-Larrea, Secretory pathways generating immunosuppressive NKG2D ligands: new targets for therapeutic intervention, *Oncoimmunology* 3 (2014) e28497, eCollection 2014.
- [51] J. Hilpert, L. Grosse-Hovest, F. Grünebach, C. Buechele, T. Nuebling, T. Raum, A. Steinle, H.R. Salih, Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses, *J. Immunol.* 189 (3) (2012) 1360–1371, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200796>.
- [52] D.A. Pollyea, J.A. Gutman, L. Gore, C.A. Smith, C.T. Jordan, Targeting acute myeloid leukemia stem cells: a review and principles for the development of clinical trials, *Haematologica* 99 (8) (2014) 1277–1284, <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.085209>.
- [53] L. Fernández, J. Valentín, M. Zalacain, W. Leung, A. Patiño-García, A. Pérez-Martínez, Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner, *Cancer Lett.* 368 (1) (2015) 54–63, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.042>.
- [54] Y. Messinger, J. Boklan, J. Goldberg, S.G. DuBois, J. Oesterheld, O. Abl, A. Martin, J. Weinstein, N. Hijiya, Combination of clofarabine, cyclophosphamide, and etoposide for relapsed or refractory childhood and adolescent acute myeloid leukemia, *Pediatr. Hematol. Oncol.* 34 (4) (2017) 187–198, <https://doi.org/10.1080/08880018.2017.1360970>.

Clinical grade activated Natural Killer products for adoptive immunotherapy against high-risk malignancies

Antonio Pérez-Martínez, Dolores Corral Sánchez, Lucía Fernández, Jaime Valentín, Raquel de Paz, Rebeca Rodríguez, Alejandra Leal and Joaquín Martínez
Pediatric Hemato-Oncology Department. La Paz University Hospital. Universidad Autónoma de Madrid. Spain.

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

In recent years, different clinical-grade highly active human Natural Killer (NK) cell products are being used against relapse or refractory tumors. Efficiency depends largely on NK cell recovery, T cell depletion and cytotoxicity of the obtained products.

The aim of our study is to investigate these characteristics in three different good manufacturing practice (GMP)-grade NK cell products used in three different clinical trials and compare the final products.

METHODS

We have infused three different activated NK cell products obtained through:

1. Enrichment from healthy haploidentical donors peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected by non-mobilized apheresis by a two steps procedure: depletion of CD3+ cells and selection of CD56+ cells, using CliniMACS device and posterior ex-vivo stimulation with 10 ng/ml of IL-15 overnight (37°C and 5% CO₂) (**NKIL15**)

2. Expansion from healthy haploidentical PBMCs obtained from whole blood using as feeder K562 cells expressing interleukin (IL)-15 and 4-1 BB Ligand (BBL) (K562-mb15-41BBL) in cell culture for 21 days (**allogenic NKA**).

3. Expansion from autologous PBMCs using the same technique described above. (**autologous NKA**)

The final cell products were analyzed for microbiological test and by flow cytometry for CD3+CD56- and CD3-CD56+ cells.

The NK cytotoxic activity was tested in a 2h BATDA release assay against K562, A673, Jurkat and U266 in an 8:1 E/T ratio.

These products were infused on 17 patients suffering from advanced malignancies on three different clinical trials:

1. Haploidentical NKIL15 on six pediatric refractory sarcomas. The infusion was performed on day +30 of a haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with CD3/CD19 depletion. Patients received conditioning with busulfan, fludarabine, thiotepa and thymoglobulin.

2. Haploidentical NKA on six pediatric refractory acute leukemias. Patients previously received salvage chemotherapy. The infusion was performed 24 hours after completing chemotherapy and having undergone 14 days of culture.

3. Autologous NKA on five adults patients suffering from high risk myeloma (relapse or refractory) associated with salvage chemotherapy.

In this study we analyzed thirty-one activated NK cell products which:

-Haploidentical NKIL15 (n=8)

-Haploidentical NKA (n=9)

-Autologous NKA (n=14)

The following results were obtained:

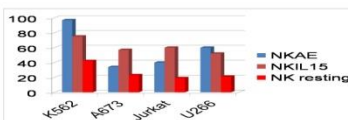
NKIL15	MEDIAN	RANGE
NK cells infused	5,14x10 ⁸	4,14x10 ⁷ – 1,5x10 ⁹
T cells infused	2,8x10 ³	0 – 2,2x10 ⁴
NK cell recovery	25%	10% – 41%
T cell depletion	5,34x10 ⁻⁵	

HAPLOIDENTICAL NKA	MEDIAN	RANGE
Expansion ratio NK cells day +14	317,2	28 – 1547
Expansion ratio T cells day +14	2,77	0,13 – 5

AUTOLOGOUS NKA	MEDIAN	RANGE
Expansion ratio NK cells day +14	74,4	13 – 551
Expansion ratio T cells day +14	0,36	0,0001 – 1,7

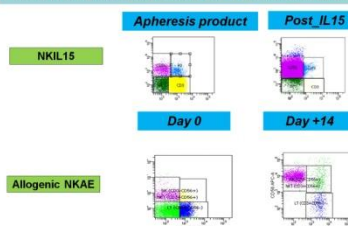
	NK INFUSED		LT INFUSED	
	MEDIAN	RANGE	MEDIAN	RANGE
NKIL15	5,14 X 10 ⁸	1,17-4,95 X 10 ⁹	2,81 X 10 ³	0-2,24 X 10 ⁴
HAPLO NKA	7,93 X 10 ⁸	1,29 X 10 ⁶ -5,84 X 10 ⁹	5,91 X 10 ⁷	1,4 X 10 ⁷ – 2,04 X 10 ⁹
AUTO NKA	7,07 X 10 ⁸	3,07 X 10 ⁸ – 1,35 X 10 ⁹	2,06 X 10 ⁷	0 – 6,92 X 10 ⁷

CYTOLYTIC ACTIVITY



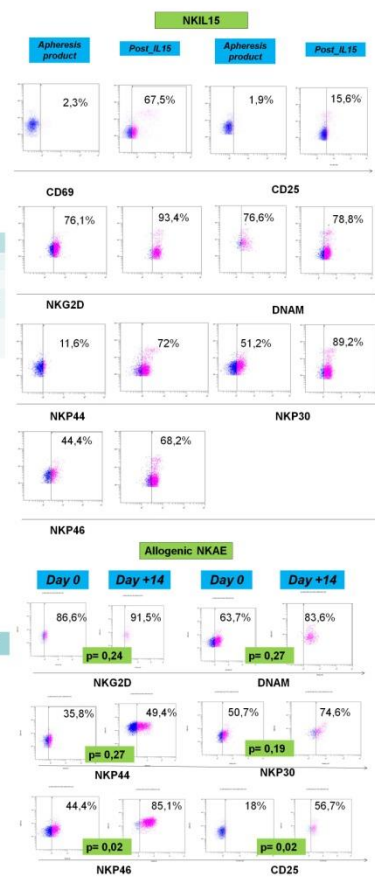
Ratio 8:1	P
NK RESTING VS NKA	0,016
NK RESTING VS NKIL15	0,04
NKIL15 VS NKA	0,008

PRODUCTS PHENOTYPE BY FLOW CYTOMETRY



RESULTS

RECEPTOR EXPRESSION ON CELL PRODUCTS



CONCLUSIONS

1. The amount of NK cells obtained from NKIL15 and allogenic NKA products were similar.
2. Expansion of T cells was minimal in NKA but T cells were significantly much lower in NKIL15 product. The T cells contained were lower in NKIL15 and autologous NKA product than in allogenic NKA.
3. Allogenic NKA product contained higher NK cells and significantly higher T cells than autologous NKA product.
4. In the final products the expression of activating receptors were increased from NK resting and NKA and NKIL15 products had a significantly higher lytic activity than unstimulated NK cells.

In conclusion, our results indicate that different procedures of GMP-grade purification of highly activated NK cells with extremely low T cell content are feasible.

IL15/4-1BBL activated and expanded Natural Killer cells in paediatric patients with refractory acute leukaemia

Corral Sánchez D¹, Valentín J², Bueno D³, Carrasco P⁴, de Paz R⁵, Rodríguez R⁶, Fernández L⁷, Balas A⁸, Vicario JL⁹, Campana D¹⁰, Martínez J¹¹, Pérez Martínez A.^{*12}
¹Pediatría, Universidad Autónoma de Madrid, ²Unidad Innata, Instituto de Investigación La Paz, ³Unidad de Hemato-Oncología Infantil, Hospital La Paz, ⁴Hemato-Oncología Pediátrica Molecular, Instituto de Medicina Molecular y Genética (IMAGEN), ⁵Hematología Hospital Universitario La Paz, ⁶Unidad de Inmunología, Hospital Universitario La Paz, ⁷Investigación clínica, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), ⁸Histocompatibilidad, ⁹Unidad de Tipaje HLA, Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain, ¹⁰Department of Paediatrics, National University of Singapore (NUS), University of Singapore (NUS), Singapore, ¹¹Servicio de Hematología, Hospital Universitario 12 de Octubre, ¹²Hemato-Oncología Infantil, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Current therapies fail in most children with refractory or relapse leukaemia. Novel therapies are needed.

In recent years, different clinical-grade highly active human Natural Killer (NK) cell products are being used against relapse or refractory tumors.

Leukaemia cells are susceptible to be killed by activated NK cells. Highly activated/expanded NK cells can be generated ex-vivo by stimulation with the human leukocyte antigen-deficient cell line K562, genetically modified to express 41BB-ligand and membrane-bound interleukin-15, developed at SJCRH (Memphis, TN).

The aim of our study is to test the safety and feasibility of haploidentical activated and expanded NK cell therapy in this heavily pre-treated paediatric population in two phase I/II trials (EudraCT: 2012-005146-38 and EudraCT: 2012-000054-63).

PATIENTS AND METHODS

Nineteen children with a median age of 12 years (11 male, 8 female) included in these trials.

Children had refractory/relapsed acute leukaemia
 -5 B cell lymphoblastic leukaemia
 -7 T cell lymphoblastic leukaemia
 -1 biphenotypic leukaemia
 -6 acute myeloid leukaemia

10 of them had received stem cell transplantation (SCT) prior to clinical trial (3 haploidentical SCT, 7 allogeneic SCT).

They were treated with rescue chemotherapy followed by the infusion of fresh activated and expanded NK cells obtained from haploidentical donor peripheral blood followed by three times a week subcutaneous administration of low dose of IL-2 (2×10^6 UI).

Donor was father (9 patients), mother (7 patients) and sister (3 patients).

Rescue chemotherapy consisted in:
 -cyclophosphamide-fludarabine (4 patients)
 -clofarabine-cyclophosphamide-etoposide (6 patients)
 -FLAG-IDA (3 patients)
 -etoposide-cyclophosphamide-nelarabine (6 patients)

Patients on trial 2012-005146-38 received two infusion per cycle while patients on trial 2012-000054-63 received one infusion.

RESULTS

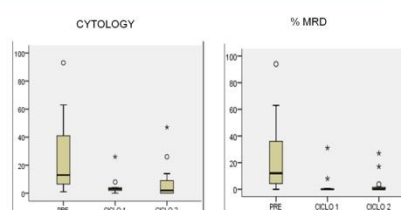
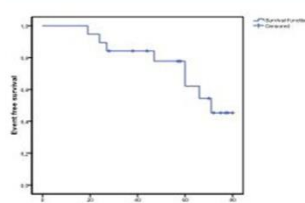
We have infused 50 NK cell products containing a median of 11.74×10^6 /kg. Two patients received one infusion, 6 patients received two infusions and 9 patients received four infusions. Two patients received none infusions because they died for toxicity related to chemotherapy.

Fourteen patients have completed treatment; in 5 additional patients treatment could not be completed because of leukemia progression ($n = 2$) or chemotherapy-related toxicities ($n = 3$). These toxicities were exacerbation GVHD, pericardial effusion and typhilitis.

Infusions were well tolerated. Four patients have fever related with infusion.

Among the 14 patients who completed the treatment, 6 achieved cytological remission with negative minimal residual disease, 6 had cytological remission with positive minimal residual disease and 2 had disease progression. All patients that achieved negative minimal residual disease received an allogeneic stem cell transplantation. Four of them are leukemia-free with a median of 200 days post-trasplant.

Patient	Disease	previous SCT	MOpre(%blast /MRD)	MOpos(%blast /MRD)	Status at end of the trial
1	ALL-T relapse postSCT mismatch unrelated donor	yes	8/5,94	nv/0,09	Graft versus host disease reactivation and death with MRD +
2	ALL-T relapse postSCT match related donor	yes	19/112	2/0,00	Cytological remission with MRD-
3	ALL-T refractory	no	63/63	26/27	Progressive disease
4	ALL-T refractory	no	17/36	3/0,02	Cytological remission with MRD+
5	ALL-T refractory postSCT match related donor	yes	1/2,1-2,3	0/0,00	Cytological remission with MRD-
6	ALL-T/lymphoma refractory postSCT match related donor	yes	nv/94	1,5/0,38	Cytological remission with MRD+
7	ALL-B refractory relapse	no	8/0,4	3,5/0,05	Chemotherapy related death with MRD +
8	ALL-B relapse after haploidentical SCT	yes	71/44	--	Progressive disease
9	Secondary AML relapse after 2 SCT (match unrelated donor/haploidentical)	yes	63/45	2/0,25	Cytological remission with MRD+
10	Biphenotypic Leukemia refractory relapse	no	8/9,57	0/0,00	Cytological remission with MRD-
11	AML refractory relapse	no	96		Chemotherapy related death
12	AML refractory	no	4/3,1	47/17	Progressive disease
13	AML refractory	no	13/12,0	14/1,5	Progressive disease
14	ALL-T relapse after 2 ^o match related donor SCT	yes	1/0,00	0/0,00	Cytological remission with MRD-
15	AML relapse	no	7/4,3	0/0,00	Chemotherapy related death with MRD +
16	ALL-B refractory after haplo-SCT	yes	nv/18	3/0,28	Cytological remission with MRD+
17	ALL-B relapse after match unrelated donor SCT	yes	13/13	4/0,00	Cytological remission with MRD-
18	ALL-B refractory relapse	no	51/36	2/0,00	Cytological remission with MRD-
19	AML relapse after haploidentical SCT	yes	17/7,5	2/0,05	Cytological remission with MRD+



CONCLUSIONS

1. Infusion of fresh activated and expanded NK cell therapy was feasible and safe in a heavily pre-treated paediatric population.
2. NK cell infusions were well tolerated except fever in some patients. No significant adverse effects appear.
3. NK cell therapy can get cytological remission in a high percentage of patients.
4. In conclusion, NK cell therapy should be further investigated in patients with high-risk leukaemia.

References:

1. Rubnitz JE et al. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62:1468-72.
2. Rubnitz JE et al. *J Clin Oncol*. 2010;28:955-9.
3. Curti A et al. *Blood*. 2011;118:3273-9.

Email: aperezmartinez@salud.madrid.org